

**ZYTOLOGISCHE UND IMMUNOLOGISCHE ÜBERWACHUNG
HERZTRANSPLANTierter PATIENTEN IN MÜNCHEN**

HERMANN REICHENSPURNER

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547927_0035

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der Universität München

Direktor: Professor Dr.Dr. W.Brendel

in Zusammenarbeit mit der Herzchirurgischen Klinik der Universität München

Direktor: Professor Dr.Dr. W.Klinner

ZYTOLOGISCHE UND IMMUNOLOGISCHE ÜBERWACHUNG HERZ-
TRANSPLANTierter PATIENTEN IN MÜNCHEN

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hermann Reichenspurner

München 1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. W. Kliner

Prof. Dr. A. Baethmann

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. W. Brendel

Prof. Dr. G. Riethmüller

Dekan:

Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

30. 7. 1986

Inhaltsverzeichnis

A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	4
I <u>Patientengut</u>	4
1. Indikation zur Herztransplantation	4
2. Selektionskriterien für Herzempfänger	4
3. Voraussetzungen zur Herztransplantation	5
4. Operative Technik	6
5. Immunsuppression	8
a) Konventionelle immunsuppressive Therapie	8
b) Ciclosporin Therapie	9
c) Konversionen der immunsuppressiven Therapie	11
6. Postoperative Standarduntersuchungen	11
a) Abstoßungsdiagnostik	11
α) Perkutane transvenöse Endomyokardbiopsie	11
β) Klinische Parameter	14
b) Diagnostik von Infektionen	14
II <u>Methodik des zytoimmunologischen Monitoring</u>	16
1. Blutprobe	16
2. Differentialblutbild	16
3. Isolierung des mononukleären Konzentrates	17
4. Rosetten-Test	18
5. Erstellung von Zytozentrifugen-Präparaten	19
6. Differenzierung der mononukleären Zellen	22

a) Verwendetes Mikroskop und Zubehör	22
b) Zellbeschreibung	22
5. Monoklonale Antikörper	27
a) Definition	27
b) Auswahl	28
c) Technik der Zellmarkierung durch indirekte Immunfluoreszenz	29
d) Fluoreszenzmikroskopie	30
e) Quotient OKT4/OKT8	
6. Errechnung der Absolutzahlen von Lymphozyten und -Subpopulationen	32
7. Definition von "Aktivierung" innerhalb des mono- nukleären Zellbildes	33
8. Statistische Grundlagen	33
C. ERGEBNISSE	35
I <u>Ergebnisse unter konventioneller immunsuppressi- ver Therapie</u>	35
1. Fallbeschreibung Patient Z.-N.	35
a) Klinische Ergebnisse	35
b) Korrelation ATG-Therapie mit Rosetten-Test bzw. mit den Absolutzahlen der T-Lymphozyten	36
c) Vergleich Rosetten-Test und monoklonaler Antikörper OKT3	38
2. Fallbeschreibung Patient L.	40

a) Klinische Ergebnisse	40
b) Korrelation ATG-Therapie mit Rosetten-Test bzw. mit den Absolutzahlen der T-Lymphozyten	40
c) Vergleich Rosetten-Test und monoklonaler Anti- körper OKT3	41
3. Sensitivität des Rosetten-Tests bezüglich Ab- stoßungsreaktionen	45
II <u>Ergebnisse unter Ciclosporin Therapie</u>	46
1. Klinische Ergebnisse	46
a) Geschlechts- und Altersverteilung der trans- plantierten Patienten	47
b) Grundkrankheiten der transplantierten Pa- tienten	47
c) Operative Komplikationen	47
d) Abstoßungsreaktionen	48
e) Virusinfektionen	50
f) Infektionen nichtviraler Genese	51
g) Postoperatives Organversagen	52
h) Langzeitergebnisse der transplantierten Patienten	53
2. Experimentelle Ergebnisse	53
a) Veränderungen im peripheren Blut während Abstoßungsreaktionen nach orthotoper Herz- transplantation	54

α)	Quantitative Veränderungen der Leukozyten und Lymphozyten vor und während Abstoßungsreaktionen	54
β)	Auftreten aktivierter Lymphozyten und Lymphoblasten vor und während Abstoßungsreaktionen	54
γ)	Verschiebungen innerhalb der Lymphozyten-subpopulationen	57
δ)	Einfluß von Methylprednisolon auf Abso-lutzahlen der Lymphozyten	59
ε)	Fallbeschreibung von Abstoßungsreaktionen an Patient R.R.	59
b)	Virusinfektionen	63
α)	Quantitative Veränderungen der Leukozyten, Gesamtlymphozyten und Lymphozytensubpopula-tionen vor und während Virusinfektionen	63
β)	Verschiebungen innerhalb der Lymphozyten-subpopulationen	63
γ)	Fallbeschreibung einer Virusinfektion an Patient K.H.	64
c)	Zytologische und immunologische Veränderungen bei Pankreatitis	66
d)	Zytologische und immunologische Veränderungen bei pulmonaler Tuberkulose	69
e)	Korrelation des durch OKTM markierten Anteils der mononukleären Zellen zur Klinik	71

f) Summarische Gegenüberstellung zyto-immunologisches Monitoring und Endomyokardbiopsie	71
g) Klinische Anwendung des zyto-immunologischen Monitoring	73

D. DISKUSSION 75

I Diskussion der Methode 75

1. Immunologisches Monitoring nach Herztransplantation unter konventioneller Immunsuppression	75
2. Zyto-immunologisches Monitoring herztransplan- tierter Patienten unter Ciclosporin Therapie	76
3. Rechtsventrikuläre Endomyokardbiopsie	78

II Diskussion der klinischen Ergebnisse 79

III Diskussion der experimentellen Ergebnisse 81

1. Immunologisches Monitoring zur Dosierung von ATG und zur Diagnostik von Abstoßungsreaktionen unter konventioneller Immunsuppression	81
2. Zyto-immunologisches Monitoring unter Ciclosporin Therapie	82
a) Veränderungen der Gesamtzahl von Leukozyten, Lymphozyten und -Subpopulationen während Ab- stoßungsreaktion	82
b) Auftreten von Lymphoblasten und aktivierten Lymphozyten während Abstoßungsreaktionen	83
c) Verschiebungen innerhalb der Lymphozytensub- populationen während Abstoßungsreaktionen	87

d) Wertigkeit des zyto-immunologischen Monitorings bezüglich der Bestätigung der Abstoßungstherapie	88
e) Fallbeschreibung einer Abstoßungsreaktion	89
f) Veränderungen im peripheren Blut während Virusinfektionen	90
g) Veränderungen im peripheren Blut bei Pankreatitis und pulmonaler Tuberkulose	91
3. Vergleich der Wertigkeit des zyto-immunologischen Monitorings und der Endomyokardbiopsie	92
4. Klinische Anwendung des zyto-immunologischen Monitorings	94
5. Alternative, nichtinvasive Methoden zur Diagnostik von Abstoßungsreaktionen	95
E. ZUSAMMENFASSUNG	97
F. LITERATURVERZEICHNIS	100
G. ANHANG	118

Abkürzungen:

AR	= Abstoßungsreaktion
ATG	= Antithymozytenglobulin
CsA	= Ciclosporin
EMB	= Endomyokardbiopsie
HTP	= Herztransplantation
KBR	= Komplementbindungsreaktion
Leu	= Leukozyten
Ly	= Gesamtlymphozyten
B Ly	= B-Lymphozyten
T Ly	= T Lymphozyten
akt.Ly	= aktivierte Lymphozyten
LyBl	= Lymphoblasten
McAb	= monoklonale Antikörper
p.o.	= postoperativ
VI	= Virusinfektion

A. EINLEITUNG

Erst 13 Jahre nach der Erstoperation am 3.12.1967 durch BARNARD (4), hat sich die orthotope Herztransplantation Anfang der 80er Jahre zu einer klinisch anerkannten Methode zur Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz durchgesetzt.

Neben technischen und hämodynamischen Problemen werden vor allem AR und Infektionen als limitierende Faktoren in der postoperativen Phase verantwortlich gemacht.

Die rechtzeitige Diagnose von AR ist deshalb sehr wichtig, da eine irreversible Abstoßung des transplantierten Herzens im Gegensatz zur AR einer transplantierten Niere bei nicht rechtzeitiger Zweittransplantation zum Tode des Patienten führt. Mit Einführung der perkutanen, transvenösen EMB durch CAVES gelang hierbei ein entscheidender Durchbruch (10,22,23). Diese Methode stellt allerdings eine invasive Untersuchung dar, die nicht täglich durchgeführt werden kann.

Unter konventioneller Immunsuppression, bestehend aus Azathioprin, Kortikosteroiden und ATG ergaben sich auch nichtinvasive Methoden zur Diagnostik von AR. Zum einen ist hier die Berechnung der Summenvoltage des QRS-Komplexes im Oberflächen-EKG zu nennen. Eine Abnahme dieser Voltage um mehr als 20% konnte mit dem Auftreten von AR korreliert werden (58). Ferner wurde ein immunologisches Monitoring herangezogen (sog. Ro-

settentest), wobei die T-Lymphozyten im peripheren Blut mit Schafs-Erythrozyten markiert und prozentual ausgezählt werden (8). Ein Ansteigen des Anteils von T-Lymphozyten im peripheren Blut unter ATG-Therapie war ein sehr früher Hinweis auf eine bevorstehende AR (80).

Ende der 70iger Jahre wurde der Pilzmetabolit Cyclosporin A als neues Immunsuppressivum entdeckt. Seit 1981 wird das inzwischen künstlich synthetisierte CsA bei klinischer HTP erfolgreich eingesetzt. Die Intensität und Anzahl von AR und Infektionen sank unter dieser Therapie in Kombination mit niedrig dosierten Kortikosteroiden beträchtlich (78). Die gesamten nichtinvasiven Parameter zur Erkennung von AR, wie Oberflächen-EKG und Rosettentest haben aufgrund des mitigierten Verlaufs von AR unter CsA ihre Wertigkeit verloren (79,105). Die invasive EMB blieb somit das einzige diagnostische Standardverfahren zur Diagnose von AR.

Nachdem das Institut für Chirurgische Forschung in München nach Wiederaufnahme der HTP in der Klinik bereits über jahrelange Erfahrung bei Feinnadelaspirationszytologie von transplantierten Nieren verfügte (52), lag es nahe, auch nach HTP zytologische Kriterien zur Diagnose von AR zu suchen. Eine Feinnadelbiopsie ist am Herzen aufgrund der zu erwartenden Komplikationen nicht möglich. Somit wurde ein "zytologisches und immunologisches Monitoring" (ZIM) im peripheren Blut erarbeitet, welches in dieser Studie beschrieben wird. Entwickelt wurde dieses ZIM an-

hand eines Tierversuchmodells. Dabei wurde nach HTP am Hund ohne Immunsuppression das periphere Blut zytologisch auf Veränderungen innerhalb der Lymphozyten vor und während AR untersucht. Es wurden nach Ficoll-Isopaque Separation die mononukleären Zellen in reife oder sich ihrer Zellstruktur anders auszeichnende lymphozytäre Zellgruppen unterschieden. Aufgrund der Erfahrungen an Feinnadelaspirationszytologien wäre während AR das Auftreten von Lymphoblasten bzw. aktivierten Lymphozyten im mononukleären Konzentrat zu erwarten. Die im Tierversuch gewonnenen Resultate bestätigten diese Erwartungen. In dieser Studie wurde die Anwendbarkeit dieses zytologischen Testes auf die Diagnose von AR nach klinischer HTP untersucht. Ein weiteres Ziel war es, herauszufinden, ob mit der Hilfe von monoklonalen Antikörpern (McAb) eine Abgrenzung innerhalb verschiedener inflammatorischer Vorgänge, wie AR und Infektionen, möglich ist.

B. MATERIAL UND METHODEN

I Patientengut

1. Indikation zur Herztransplantation

In dieser Studie wurden 11 Patienten der Herzchirurgischen Universitätsklinik München, Großhadern und 1 Patient des Deutschen Herzzentrums in München untersucht.

Die Indikation zur HTP wurde nach ausführlicher kardiologischer Voruntersuchung gestellt. Geeignete Patienten sollten Beschwerden einer Herzinsuffizienz bei geringer Belastung oder bereits in Ruhe aufweisen (entsprechend Stadium III oder IV nach der Klassifizierung der New York Heart Association).

Folgende Grundkrankheiten stellen im allgemeinen die Indikationen zur HTP (60):

- a) Kongestive Kardiomyopathie (43%),
- b) Koronare Herzkrankheit (41%),
- c) angeborene bzw. erworbene Herzklappenvitien (5%),
- d) als seltene Indikationen: angeborene Herzfehler, Herztumoren (1 - 2%).

2. Selektionskriterien

Verschiedene Voraussetzungen müssen bei einem potentiellen Empfänger vor einer HTP gegeben sein (85):

- a) Alter unter 55 Jahre,
- b) pulmonaler Gefäßwiderstand weniger als 8 Wood Einheiten,
- c) Fehlen von akuten oder chronischen Infektionen,
- d) kein insulinbedürftiger Diabetes mellitus,
- e) keine Lungenembolie innerhalb der letzten 6 Wochen,
- f) keine systemischen Stoffwechsel- oder Tumorerkrankheiten,
- g) psycho-soziale Stabilität,
- h) kalkulierbare Chance auf Rehabilitation.

3. Voraussetzungen zur Herztransplantation

Nach Akzeptierung des Herzempfängers auf der Warteliste muß für eine geplante HTP ein passendes Spenderorgan verfügbar sein. Geeignete Herzspender sollten zwischen 15 und 40 Jahre alt sein und der Hirntod muß von einem Neurologen einwandfrei festgestellt worden sein. Die Kreislaufsituation des hirntoten Patienten sollte bis zur Herzentnahme stabil sein. Die Blutgruppen von Spender und Empfänger müssen im ABO-System übereinstimmen. Organe von Spendern der Blutgruppe 0 können ohne Berücksichtigung der Empfängerblutgruppe implantiert werden. Eine weitere Voraussetzung ist eine negative Lymphozyten-Kreuzprobe (41). Es wird dabei Serum des Empfängers gegen Lymphozyten des Spenders getestet. Falls

präformierte Antikörper gegen die Zellen des Spenders in dem Serum vorhanden sind, fällt dieser Test positiv aus und das Risiko einer hyperakuten Transplantatabstoßung ist erhöht (60).

4. Operative Technik

Die orthotope HTP erfolgte bei allen Patienten nach der Technik von LOWER, STOFFER und SHUMWAY (71):

a) Explantation des Spenderherzens.

Es erfolgt eine mediosternale Thorakotomie. Nach Präparation des Herzens werden die großen Hohlvenen ligiert und die Aorta ascendens abgeklemmt. Der proximale Anteil der Vena cava inferior und eine Lungenvene werden inzidiert, um ein Abfließen der Perfusionslösung zu gewährleisten. Zur Myokardprotektion wird das Herz via Aorta ascendens mit einer kardioplegischen Lösung nach BRETSCHNEIDER perfundiert (16). Anschließend wird das Organ nach Durchtrennung von der Aorta ascendens, A.pulmonalis, Vena cava superior et inferior, und den Lungenvenen explantiert (Abb.1).

b) Implantation des Spenderherzens.

Beim Herzempfänger wird nach Anschluß an die Herzlungenmaschine das kranke Herz unter Belassung der jeweiligen Hinterwände des rechten und linken Vorhofes exziiert. Die Präparation des Spenderherzens erfolgt nach der Technik von SHAPIRO (99), wobei die Vena cava superior ligiert wird und der rechte Vorhof von der Vena cava inferior her längs eröffnet wird. Der Sinusknoten wird somit nicht



Abb.1: Explantationstechnik des Spenderherzens

durch eine Inzision gefährdet. Der linke Vorhof wird an den 4 Abgängen der Lungenvenen eröffnet. Das Spenderherz wird nun in folgender Anastomosenreihenfolge implantiert: Es erfolgt zunächst die Anastomose des linken Vorhofes, anschließend werden die beiden rechten Vorhofhälften miteinander vernäht und es folgen die Anastomosierungen der A.pulmonalis und der Aorta ascendens (Abb.2).

Während der Reperfusion an der Herzlungenmaschine wird die kardioplegische Lösung aus den Koronararterien eliminiert und das Herz beginnt sich in der Regel spontan zu defibrillieren. Sobald das Herz in der Lage ist, den



Abb. 2: Implantationstechnik des Spenderherzens

Kreislauf selbstständig zu übernehmen, werden die Kanülen von der Herzlungenmaschine aus den großen Gefäßen entfernt. Nach sorgfältiger Blutstillung erfolgt der mehrschichtige Thoraxverschluß.

5. Immunsuppression

a) Konventionelle immunsuppressive Therapie

Die beiden ersten Patienten dieser Studie wurden konventionell immunsuppressiv therapiert (104,116).

Diese Behandlung bestand aus einer 3er-Kombination von Azathioprin, Kortikosteroiden und Antithymozyten-

globulin (ATG, Fa.Fresenius, Frankfurt). Die jeweilige Dosierung richtete sich nach den Angaben der Stanford Klinik (60). Dabei wurde Azathioprin zwischen 1,5 und 2,0 mg/kg KG dosiert. Die folgenden Tagesmengen richteten sich nach den aktuellen Leukozyten- bzw. Thrombozytenzahlen. Kortikosteroide wurden in den ersten 24 Stunden als Methylprednisolon intravenös appliziert (3 x 125 mg) und später oral als Prednison in der Dosis von 1,5 mg/kg KG verabreicht. Die Gesamtmenge wurde täglich um 2,5 mg verringert. Die Dosis wurde laufend reduziert bis zu einer Gabe von 0,2 mg/kg KG Prednison pro Tag. ATG wurde in einer Dosis von 0,25 - 12 mg/kg KG appliziert, wobei der Anteil der T-Lymphozyten im mononukleären Konzentrat, welcher mit Hilfe des Rosetten-tests ermittelt wurde, zwischen 5 und 10% liegen sollte (62,69).

Die Therapie von AR bestand zum einen in der Gabe von 1 g Methylprednisolon an 3 aufeinanderfolgenden Tagen. Zum anderen wurde die Tagesdosis von Prednison auf 1,5 mg/kg KG angehoben und die ATG-Dosierung gesteigert mit dem Ziel, den Prozentsatz der T-Lymphozyten im peripheren Blut auf unter 5% zu senken.

b) Ciclosporin Therapie

CsA (Sandimmun^R, Fa.Sandoz, Basel, Schweiz) stellt ein relativ neues Immunsuppressivum dar, das seit 1981 Anwendung in der klinischen Herztransplantation findet

(78). Es handelt sich dabei um ein zyklisches Polipeptid, welches aus 11 Aminosäuren besteht. CsA wurde 1976 von BOREL et al. und RÜGER et al. als neues Immunsuppressivum entdeckt. CsA ist primär ein Metabolit der Pilze *Cylindrocarpum lucidum* und *Trichoderma polysporum*. Inzwischen wird CsA künstlich synthetisiert.

Seine Hauptwirkung besteht in der Hemmung von T-Zell-interaktionen. Durch eine verminderte Freigabe von Interleukin 1 aus Makrophagen werden die T-Helferzellen ihrerseits an der Freigabe von Interleukin 2 gehindert. Damit werden die zytotoxischen T-Vorläuferzellen in ihrer Proliferation beeinflusst. Entscheidende Nebenwirkungen des Medikaments sind die Nephro- und Hepatotoxizität, eine Hypertrichose, eine Hyperplasie der Gingiva und ein geringgradiger Tremor (14, 120).

Ab dem dritten Patienten wurden alle Patienten dieser Studie mit CsA zusammen mit niedrigen Dosierungen von Prednison immunsupprimiert (84). Die tägliche Dosis von CsA betrug initial 18 mg/kg KG zusammen mit 2 mg/kg KG Prednison. Die verabreichte Menge beider Medikamente wurde täglich entsprechend dem Stanford-Therapieprotokoll reduziert (78). Der Serumspiegel von CsA im Radioimmun-Assay sollte dabei Werte zwischen 80 und 150 ng/ml betragen. Prednison wurde innerhalb von 6

Wochen kontinuierlich auf 0,15 mg/kg KG/die herabgesetzt.

AR wurden mit 1 g Methylprednisolon als Einzelinjektionen über 3 Tage behandelt. Bei therapieresistenter AR wurden weitere 3 g Methylprednisolon in den nächsten 3 Tagen gegeben. Die zusätzliche Applikation von ATG bei einer kortisonresistenten AR war bei allen in dieser Studie aufgeführten Patienten nicht notwendig.

c) Konversionen der immunsuppressiven Therapie

Die beiden ersten konventionell behandelten Patienten wurden am 28. bzw. 73. Tag p.o. auf CsA mit niedrig dosiertem Prednison umgestellt. Ein Patient wurde 2 Jahre nach HTP aufgrund einer CsA-induzierten Glomerulosklerose mit Niereninsuffizienz von CsA auf Azathioprin und Prednison konvertiert.

6. Postoperative Standarduntersuchungen

a) Abstoßungsdiagnostik

α) Rechtsventrikuläre Endomyokardbiopsie.

In Lokalanästhesie wird die rechte V.jugularis interna punktiert. Nach Einlegen eines Einführungsbesteckes wird unter Röntgenkontrolle eine Biopsiezange (Fa.Scholten Instruments, San Francisco, USA) in den rechten Ventrikel vorgeschoben und 3

bis 6 Gewebeproben aus dem Bereich der rechten Ventrikelwand und des Ventrikelseptums entnommen (Abb.3).

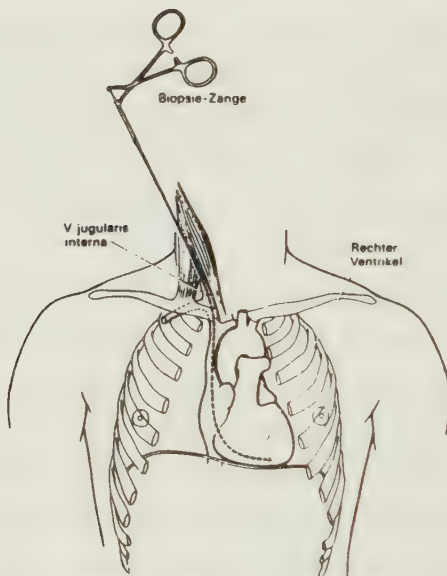


Abb.3: Durchführung einer rechtsventrikulären Endomyokardbiopsie

Von den Gewebeproben wurden im Pathologischen Institut Schnitte angefertigt und gefärbt.

Nach BILLINGHAM werden AR in 4 Schweregrade unterteilt (10):

1. Leichte AR mit perivaskulären und subendokardialen mononukleären Zellinfiltraten und interstitiellem Ödem.

2. Mäßige AR mit perivaskulären, subendokardialen und interstitiellen, mononukleären Zellinfiltraten und fokalen Myozytendegenerationen.
3. Schwere AR mit zunehmenden Infiltraten von neutrophilen Granulozyten, interstitieller Hämorrhagie und Myozytennekrosen (Abb.4).
4. Abklingende AR mit rückläufigen Rundzellinfiltraten, Phagozytenansammlungen und aktiver Fibrosierung.

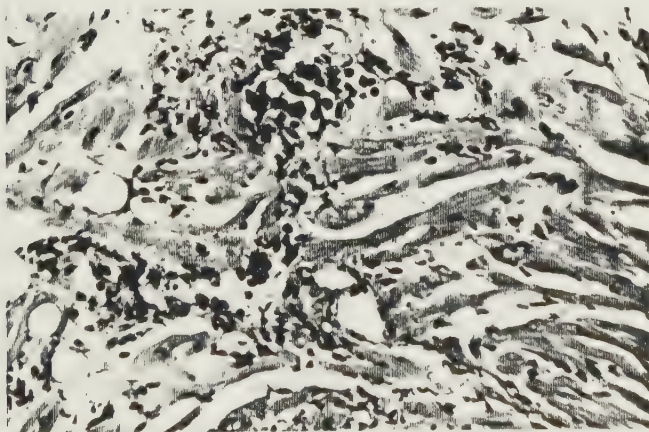


Abb.4: Schwere AR mit zahlreichen Zellinfiltraten und Myozytennekrosen

Die histologischen Untersuchungen der Myokardbiopsien stellen den "Goldstandard" bezüglich der Diagnose von AR im Vergleich zu den in dieser Studie erhaltenen Ergebnissen dar.

β) Klinische Parameter.

Unter konventioneller Immunsuppression wurde an klinischen Parametern vor allem das Oberflächen-EKG zur Diagnose von AR herangezogen: In erster Linie wird hierbei auf die Summenvoltage des QRS-Komplexes und auf den Herzrhythmus im EKG geachtet. Voltageverlust im EKG um mehr als 20% und Vorhofflattern indizieren sehr früh eine beginnende AR (58).

b) Diagnostik von Infektionen

Bei allen Patienten wurden in regelmäßigen Abständen mikrobiologische Untersuchungen vorgenommen. Wöchentlich wurden Abstriche, Blut- und Urinkulturen der Patienten entnommen und Blut der Patientenserologisch auf Virusinfektionen kontrolliert. Im Rahmen dieser Virusserologie wurden Titerbestimmungen der Komplementbindungsreaktionen für Herpes simplex-, Varizellen Zoster-, Zytomegalie- und Epstein-Barr-Virus durchgeführt. Als Parameter für

frische Infektionen wurden IGM-Titer gegen diese Virusinfektionen bestimmt. Titererhöhungen wurden zur Verlaufsbestimmung mehrfach kontrolliert.

II. Methodik des zytoimmunologischen Monitorings

1. Blutprobe

Zur Untersuchung der Patienten diene 10 ml venöses Blut vermischt mit 500 IE Heparin. Diese Blutprobe wurde zu einem festgesetzten Zeitpunkt in den ersten 20 Tagen nach HTP täglich, danach 3 mal pro Woche bis zur Entlassung der Patienten zur Untersuchung abgenommen. Vor Transplantation wurden mindestens 3 an verschiedenen Tagen gewonnenen Proben als Kontrollwerte untersucht. Nach Blutabnahme sollte bis zur Aufarbeitung ein Maximum von 2 Stunden nicht überschritten werden, um den pH-Wert konstant zu halten.

2. Differentialblutbild

Die Leukozyten wurden unter Verwendung einer Neubauer Zellkammer¹ im Hellfeldmikroskop² bei 10-facher Vergrößerung ausgezählt bzw. maschinell³ errechnet.

Pro Patient wurden 6 Objektträger⁴ mit Patientenname und fortlaufender Nummer versehen; je 2 Präparate wurden für einen Blutaussstrich und je 4 für

¹ Neubauer Zellkammern

² Hellfeld-Mikroskop, Fa. Zeiss, Oberkochen

³ Zellzählapparat

⁴ Objektträger, 76x26 mm, R. Langenbrinck

die Zellsuspension des mononukleären Konzentrates verwendet. Nach Anfertigung der 2 Blutaustriehe pro Patient wurden diese luftgetrocknet und später zusammen mit den Zytozentrifugenpräparaten des mononukleären Konzentrates nach Pappenheim gefärbt und differenziert.

3. Isolierung des mononukleären Konzentrates

Jeweils 5 ml heparinisiertes Blut wurde nach 1:1 Verdünnung mit Tris-Hank'scher Lösung⁵ auf 2 - 3 ml Ficoll-Isopaque Lösung⁶ (spezifische Dichte: 1,077 g/ml) geschichtet. Dabei erhält man nach 20-minütigem zentrifugieren bei 1200 G (entsprechend 2800 Umdrehungen/min in der Rotanda-S-Zentrifuge⁷) das sogenannte "mononukleäre Konzentrat" als Interphasenring zwischen Serum und der Ficoll-Lösung. Dieses mononukleäre Konzentrat besteht im wesentlichen aus Lymphozyten und Monozyten (15). Die restlichen Blutzellen, resp. Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten bilden aufgrund ihres höheren spezifischen Gewichtes den Bodensatz in den Reagenzgläsern. Der verbleibende Interphasenring wurde mit einer Pasteurpipette isoliert. In einem neuen Rea-

⁵ Tris-Hank'sche Lösung, pH 7,4 mit Phenolrot, Kliniksapotheke

⁶ Ficoll-Isopaque Lösung 1,077 g/ml, Kliniksapotheke

⁷ Fa. Hettich, Postfach 391, Tuttlingen

genzglas wurde das mononukleäre Konzentrat in Tris-Hank'scher Lösung⁵ 3 mal bei 1400 Umdrehungen pro Minute (entspricht 600 G) 5 Minuten gewaschen. Nach Abgießen des Überstandes wurden die mononukleären Zellen mit einer definierten Menge Tris-Hank'scher Lösung verdünnt, so daß sich eine Konzentration von 1 - 3 mal 10^{-6} Zellen/ml einstellte.

4. Rosettentest

Zur Markierung der T-Lymphozyten im mononukleären Konzentrat wurden 2-fach gewaschene Schafse erythrozyten⁸ verwendet. 200 μ l der verdünnten mononukleären Zellsuspension wurden mit 100 μ l gewaschenen Schafse erythrozyten im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert und anschließend 1 Stunde bei 4°C im Kühlschrank konserviert. Anschließend wurden 20 μ l dieser Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben und ein Deckgläschen aufgelegt. Bei 120-facher Vergrößerung wurden die rosettenförmig mit Erythrozyten umgebenen Zellen prozentual festgehalten (Abb.6). Dies entspricht dem Anteil der T-Lymphozyten im mononukleären Konzentrat.

⁸ Schafse erythrozyten, Oberschleißheim

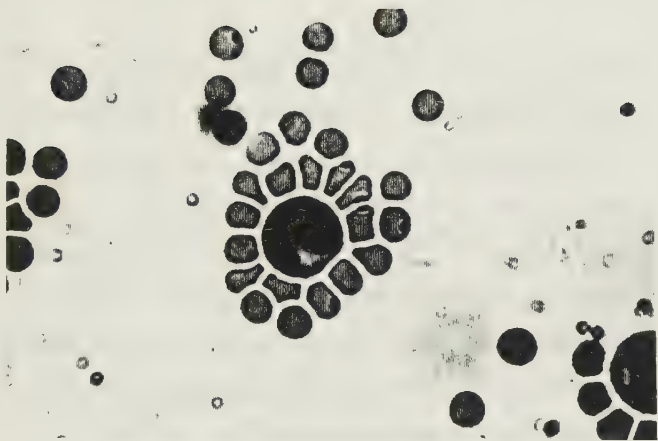


Abb.7: Mit Schafserythrozyten rosettenförmig umgebene T-Lymphozyten

5. Erstellung von Zytozentrifugenpräparaten

Spezielle Filzkartons , welche das Kulturmedium aufsaugen, wurden auf die entfetteten und beschrifteten Objektträger gelegt. Zusammen mit der zugehörigen Küvette wurden die 4 Objektträger in die Zytozentrifuge⁹ eingespannt. Mittels Eppendorf Pipetten¹⁰ wurden in 2 Küvetten je 10 μ l und in die anderen 2 Küvetten je 20 μ l der mononukleären Zel -

⁹ Zytozentrifuge, Cytospin 1, Shandon Labortechnik, Frankfurt

¹⁰ Eppendorf Pipetten 3130, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg

len mit je 150 μ l Hank'scher Lösung⁵ verdünnt und die Präparate 5 Minuten bei 500 Umdrehungen/Minute (entspricht 300 G) zentrifugiert. Durch die objektträgernahe Öffnung der Küvette kommen die Zellen in der Regel gut verteilt auf dem Objektträger zu liegen. Die Kulturflüssigkeit wird von den Filzkartons aufgesogen. (Abb.5). Nach Ablauf der Zentrifugenzeit wurden die Präparate entnommen und mindestens 10 Minuten luftgetrocknet.

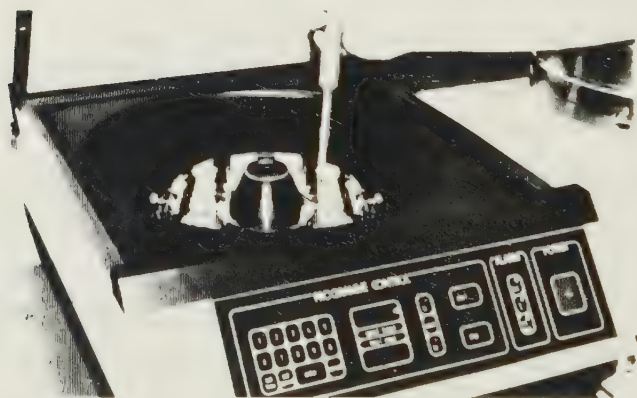


Abb.5: Zytozentrifuge

Die Blutausstriche und Zytozentrifugenpräparate wurden zur panoptischen Darstellung der Leukozyten nach Pappenheim gefärbt (7,119). Diese Färbung setzt sich zusammen aus der May-Grünwald Stammlösung¹¹ und der Giemsa-Lösung¹². Die darin enthaltenen basischen (Methylenblau) und sauren (Eosin) Farbstoffe ermöglichen eine gute Beurteilung von Zellkern und Zytoplasma. Zur Färbung wurden diese Präparate waagrecht auf die Färbebank gelegt. May-Grünwald Lösung wurde auf die Präparate aufpipettiert und die Blutzellen damit 3 Minuten fixiert. Nach Abspülen der Präparate mit Aqua bidest¹³ wurden diese mit Giemsa Lösung überschichtet. Diese Lösung muß zuvor im Verhältnis 1:20 mit Aqua bidest verdünnt und filtriert¹⁴ werden. Nach 20-minütiger Färbung wurden die Präparate mit Aqua bidest abgespült und erneut luftgetrocknet. Auf dem Objektträger verbliebene Farbspuren wurden mit Salzsäure-Äthanol-Lösung¹⁵ entfernt. Auf die gefärbten und getrockneten Präparate wurden abschließend mit

¹¹ May-Grünwald Stammlösung, Fa.E.Merck, Darmstadt

¹² Giemsa Lösung, Fa.E.Merck, Darmstadt

¹³ Aqua bidest, Kliniksapotheke

¹⁴ Papierfilter 15

¹⁵ Salzsäure - Äthanol-Lösung, Fa.Empfenzeder, München

Eukitt¹⁶ Deckplättchen¹⁷ zum Schutz des Präparates geklebt.

6. Differenzierung der mononukleären Zellen

a) Verwendetes Mikroskop und Zubehör

Zur Zelldifferenzierung wurde ein Standard-Mikroskop¹⁸ verwendet und die im Präparat vorhandenen Zellen in ein Zellgerät¹⁹ eingetippt.

Das Präparat wurde bei 120-facher Vergrößerung (12-fach vergrößerndes Okular + 10-fach vergrößerndes Objektiv) betrachtet. Es wurden nur Präparate differenziert, auf welchen die Zellen gut verteilt und mittels einer klaren Färbung einwandfrei beurteilbar waren. Falls die Zellpräparate zu dicht gepackt waren und Zellen übereinander zu liegen kamen, konnte eine exakte Differenzierung nicht erreicht werden. Nach Einstellen eines geeigneten Gesichtsfeldes wurden die gefärbten Zellen durch das Immersionsobjektiv unter Verwendung von

¹⁶ Eukitt, Fa.O.Kindler, Freiburg

¹⁷ Gläserne Deckplättchen 18x18, Fa.Menzel über Fa.Empfenzeder, München

¹⁸ Standardmikroskop, Fa.Zeiss, Oberkochen

¹⁹ Leukodiff 600, Instrumentation Laboratories, Oskamp GmbH

Immersionsöl²⁰ bei 1200-facher Vergrößerung differenziert.

Je 100 Leukozyten der beiden Blutaussstriche wurden ausgezählt. Anschließend wurden je 100 Zellen der Präparate des mononukleären Konzentrates differenziert.

Als endgültige Ergebnisse wurden Mittelwerte nach mehrfacher Auswertung angesehen.

b) Zellbeschreibung

Als zytologische und hämatologische Kriterien dienten die Angaben von BEGEMANN et al. als Grundlage zur Beurteilung der peripheren Leukozyten, der Zellen der Lympho- bzw. Myelopoese und ihrer aktivierten Reizformen (7,55,119):

Myelopoese und Granulozyten:

Juvenile Granulozyten:

Der Zelldurchmesser beträgt zwischen 12 und 16 μm , das Zytoplasma ist blaßrosa gefärbt und enthält basophile, eosinophile oder neutrophile Granula in einer Zelle. Der Zellkern färbt sich violett an und ist meist bohnenförmig gebogen mit scholligem Chromatin.

²⁰ Immersionsöl, Kliniksapotheke

Stabkernige Granulozyten:

Die Zellgröße beträgt 10 - 16 μm . Das Zytoplasma ist blaßrosa und enthält feine Granula der Metamyelozyten. Der violett angefärbte Zellkern ist stabförmig gebogen und definitionsgemäß als stabkernig zu bezeichnen, so lange die Einschnürungen innerhalb des Kernes ein Drittel der durchschnittlichen Kerndicke nicht überschreiten.

Segmentkernige Granulozyten:

Die Zellgröße liegt zwischen 10 und 16 μm . Die Einschnürung der Zellkerne überschreiten ein Drittel der durchschnittlichen Kerndicke. In den meisten Fällen sind die Kernsegmente nur noch durch feine Brücken miteinander verbunden. Das violett gefärbte Chromatin ist grobschollig.

Entsprechend ihres Zytoplasmas werden die segmentkernigen Granulozyten eingeteilt in

A neutrophile Granulozyten mit blaßrosa Zytoplasma und neutrophilen Granula.

B eosinophile Granulozyten mit hellrosa Zytoplasma und eosinophilen, rötlichen Granula;

C basophile Granulozyten mit hellrosa Zytoplasma und dunkelblauen, basophilen größeren Granula.

Monozyten:

Entsprechend ihrer Größe lassen sich kleine Monozyten (Zellgröße ca. 15 μm) und große Monozyten (Durchmesser ca. 20 μm) unterscheiden. Der Zellkern ist dunkelblau gefärbt, oval und meist nierenförmig gekrümmt oder auch bisweilen segmentiert und überlappend. Das Zytoplasma ist taubenblau gefärbt und weist bei Übergang zu Makrophagen Vakuolen auf.

Lymphopoese und Lymphozyten:

Kleine Lymphozyten (Abb.6):

Zelldurchmesser 7 - 10 μm . Die Zellform ist rund und der große runde bis bohnenförmige Kern erstreckt sich fast über die ganze Zelle. Das Chromatin ist dicht strukturiert. Das Zytoplasma ist schmal, randständig und hellblau angefärbt.

Große Lymphozyten:

Durchmesser 10 - 16 μm . Der Zellkern ist meist rund bis oval und randständig gelegen mit dichtem Chromatin. Der Zytoplasmasaum ist deutlich breiter als bei den kleinen Lymphozyten. Zeigen diese Zellen kernnahe eosinophile Granula mit einer perinukleären Aufhellung, bezeichnet man diese Zellen als "large granular lymphocytes".

Plasmazellen:

Durchmesser 7 - 15 μm . Die Zellform ist oval. Auffällig ist der Zellkern mit seiner Radspeichenstruktur bei randständiger Lage. Die Kern-Plasma-Relation hat sich zugunsten des Zellplasmas verändert mit perinukleärer Aufhellung.

Prälymphoblasten resp. aktivierte Lymphozyten

(Abb.6):

Durchmesser 10 - 16 μm . Die Kern-Plasma-Relation nimmt deutlich zugunsten des Zytoplasmas zu, wobei sich das Zytoplasma stärker basophil und somit intensiv blau anfärbt. Die Kernstruktur erscheint aufgelockert und schollig. Die Zellen unterscheiden sich vor allem in Größe und Kernstruktur von ausdifferenzierten Lymphoblasten.

Lymphoblasten (Abb.6):

Der Durchmesser erreicht Werte bis 25 - 30 μm . Das Kern-Chromatin erscheint noch aufgelockerter und ein Nukleolus wird sichtbar. Zellkern und das intensiv basophil angefärbte Zytoplasma lassen diese Lymphoblasten eindeutig von anderen Zellen abgrenzen. Ein stark basophiles blaues Zytoplasma deutet auf einen B-Lymphozyten oder Plasmoblasten hin.

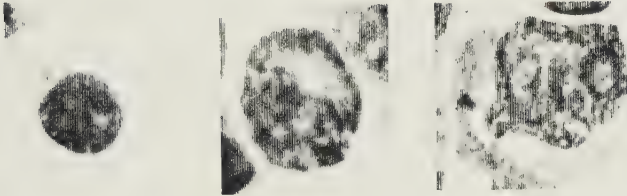


Abb.6: A: Kleiner Lymphozyt, B: Prälymphoblast, C.Lymphoblast

Nach Auszählen werden diese Zahlen prozentual festgehalten, um die Prozentzahlen später in Absolutwerte umzurechnen.

5. Monoklonale Antikörper

a) Definition

McAb sind hochspezifische Antikörper gegen Lymphozyten-Subpopulationen, deren Herstellung Mitte der 70iger Jahre von KÖHLER und MILSTEIN erstmals beschrieben wurden (65). Seit Jahren werden McAb zur Diagnostik nach Transplantation eingesetzt (26,27,30,32).

b) Auswahl

Zur Charakterisierung des Phänotyps der mononukleären Zellen wurden folgende McAb ausgewählt:

OKT3:²²

OKT3 bindet an Membranstrukturen von Thymozyten und von fast sämtlichen peripheren T-Lymphozyten (25,66, 89). Ferner wirkt dieser Antikörper auf T-Lymphozyten mitogen (118).

OKT4:

Helfer- und Inducerzell-Populationen der T-Lymphozyten werden mit diesem Antikörper spezifisch markiert (66,90,91). Diese Helferzellen stimulieren die zytotoxischen T-Lymphozyten und aktivieren Suppressor-T-Lymphozyten (75, 90,110). Die durch OKT4 gekennzeichneten Zellen sind verantwortlich für die Stimulation der B-Lymphozyten zur Entwicklung zu IGG-produzierenden Plasmazellen (91,92,122).

OKT8:

Mit diesem Antikörper werden vorwiegend die zytotoxischen und Suppressorzellen der T-Lymphozyten markiert (90,93,94,110). Suppressor- und zytotoxische Zellen können durch spezifische Antikörper noch nicht differenziert werden. Zusammen mit den Helferzellen bilden die Suppressorzellen einen Regelkreis, wobei sowohl T- als auch B-Lymphozyten zu Effektorzellen stimuliert bzw. in ihrer Proliferation supprimiert werden (97).

²²Orthopharmaceutical Inc., RARITAN, New Jersey 08869, USA

OKM1:

OKM1 bindet vorwiegend an Monozyten aber auch an Zellen der Myeloidreihe, nicht dagegen an Zellen der B- oder T-Lymphozytenreihe (16). Ferner reagiert OKM1 mit den sogenannten 0-Zellen, welche weder durch B- noch durch T-Zellantikörper markiert werden (34).

MOAK 5202²³:

Dieser Antikörper bindet an membranständige Ia-Antigen-Bindungsstellen von reifen B-Lymphozyten. Ferner wird ein kleiner Prozentsatz von 0-Zellen und Monozyten durch MOAK 5202 gebunden.

c) Technik der Zellmarkierung durch indirekte Immunfluoreszenz

Die lyophilisierten MCAB wurden in 1 ml sterilem Aqua dest²⁴ aufgelöst und 1:100 mit 0,9%iger isotoner Kochsalzlösung²⁵ verdünnt. Jeweils 100 µl der mononukleären Zellsuspension wurden mit 30 µl der verdünnten Antikörperlösung 40 - 60 Minuten bei 4°C angesetzt. Nach dieser Inkubationszeit wurden die überschüssigen, d.h. nicht an Zellen gebundenen Antikörper nach Verdünnung mit 2 ml isotoner Kochsalzlösung und Zentrifugation bei 300 G herausgewaschen.

²³Fa.O.Y.Medics APPB 819 SF 00101 Helsinki 10, Finnland

²⁴Aqua ad injectabilae, Fa. Fresenius, Frankfurt

²⁵0,9%ige isotonische Kochsalzlösung, Fa. Fresenius, Frankfurt

Als zweites Antiserum wurde ein mit Fluoreszein konjugiertes Anti-Maus-Immunglobulin vom Kaninchen verwendet²⁶. Jeweils 30 µl der 1:10 verdünnten Antikörpersuspension wurde mit den mononukleären Zellen und den membranständigen McAb 40 - 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Die überschüssigen Antikörper wurden durch Aufschwemmen und Zentrifugation herausgewaschen, der Überstand abgesaugt und die Fluoreszein-markierten Zellen mit 50 µl isotoner Kochsalzlösung²⁵ verdünnt. Als Kontrolle wurden mononukleäre nur mit dem Fluoreszein-konjugierten Antikörper in Reaktion gesetzt, um eine unspezifische Markierung auszuschließen.

d) Immunfluoreszenzmikroskopie

Wir verwendeten ein Zeiss-Fluoreszenz-Mikroskop²⁷.

Ein kleiner Tropfen der 2-fach markierten Zellsuspension wurde auf Objektträger aufgebracht und ein Deckgläschen daraufgegeben. Unter dem Mikroskop wurden dann 2 mal je 100 Zellen im Durchlicht²⁷ mit 400-facher Vergrößerung²⁷ ausgezählt. Durch Verwendung einer Hallogenglampe und spezifischer Lichtfilter²⁷ erscheinen die Zellen

²⁶ FICT-conjugated Goat-Anti-Maus-IGG, Burlingame, USA

²⁷ Zeiss Universal Fotomikroskop, Fa. Zeiss, Oberkochen
- Hallogenleuchte 12 V, 100 Watt
- Objektive: PH2, Plan 40/0,65, 160/0,17
- KP500 Kurzpassfilter, BP38 Rotfilter

im Dunkelfeld des Öl-Inversionskondensors rot und die fluoreszeierenden Antikörper leuchten grün (Abb.8). Trüb erscheinende mononukleäre Zellen sind von eventuell vorhandenen bläschenartig aussehenden Erythrozyten bei der Auszählung abzugrenzen. Die Fluoreszenzmarkierten Zellen wurden prozentual festgehalten.

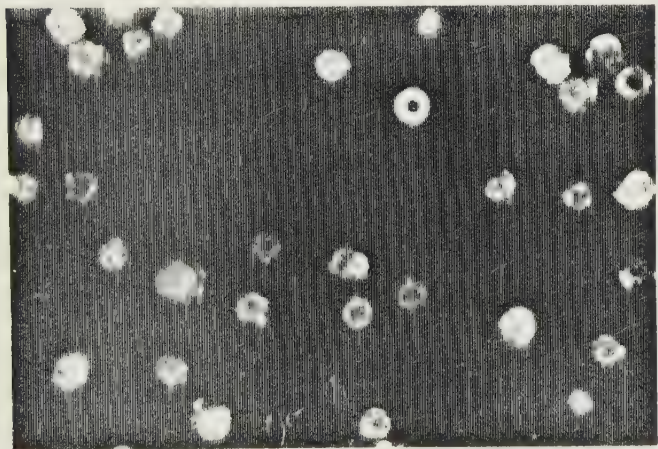


Abb.8: Mononukleäre Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die markierten Zellen erscheinen am Rand fluoreszeierend grün.

e) Quotient OKT4/OKT8

Das Verhältnis der Prozentzahlen von OKT4 zu OKT8-positiven Zellen wurde errechnet. Bei gesunden, nichttransplantierten Patienten beläuft sich dieser Quotient auf Werte zwischen 2 und 3.

6. Errechnung der Absolutzahlen von Lymphozyten und deren Subpopulationen

Die Absolutzahlen der Zellen erhielten wir in Anlehnung an frühere Studien (12):

Die Anzahl der Lymphozyten/mm³ errechnete sich aus der Gesamtzahl der Leukozyten und dem Prozentsatz der Lymphozyten im Differentialblutbild.

Die Absolutzahlen für die Lymphozytensubpopulationen, wie Lymphoblasten und Prälymphoblasten, ließen sich anhand des prozentualen Anteils dieser Zellen im mononukleären Konzentrat berechnen. Entsprechend erhielten wir die Zahlen für T- und B-Lymphozyten anhand des Prozentsatzes der OKT3-positiven T- bzw. MOAK 5202-positiven B-Lymphozyten.

Die Zahl der Prälymphoblasten und Lymphoblasten ergab die Gesamtzahl der aktivierten Lymphozyten/mm³.

Beispiel:

Patient M.M.: 10. Tag p.o. nach orthotoper HTP.

8000 Leukozyten/mm³

30% Lymphozyten im Differentialblutbild $\Rightarrow$

2400 Lymphozyten/mm³

Mononukleäres Konzentrat:

50% Monozyten, 44% Lymphozyten, 4% Prälymphoblasten,

2% Lymphoblasten (=50% Gesamtanteil an Lymphozyten).

(2:50) x 2400 = 96 Lymphoblasten/mm³

(4:50) x 2400 = 192 Prälymphoblasten/mm³

= 96 + 192 = 288 aktivierte Lymphozyten/mm³.

41% OKT3-positive Zellen im mononukleären Konzentrat:

(41:66) x 2400 = 1490 T-Lymphozyten/mm³.

7. Definition von "Aktivierung" innerhalb des mononukleären Zellbildes

Das periphere Zellbild wurde als aktiviert bezeichnet, sobald voll entwickelte Lymphoblasten im Konzentrat sichtbar wurden bzw. die Gesamtzahl der Prälymphoblasten 50 Zellen/mm³ überschritten hatte.

Bei transplantierten Patienten, welche frei von Infektionen oder AR sind, ließen sich keine Lymphoblasten im mononukleären Konzentrat beobachten.

8. Statistische Grundlagen

Die statistische Wertigkeit des untersuchten Tests errechnete sich nach dem Prinzip der 4-Felder-Tafel

2er stöchiometrisch verschiedener Parameter. Die Validität des Testes wird dabei ausgedrückt durch die Prozentzahlen für Sensitivität, Spezifität und Vorhersagerichtigkeit bezüglich AR. Statistische Signifikanzen errechneten sich nach dem Student-t-Test.

C ERGEBNISSE

I Ergebnisse unter konventioneller immunsuppressiver Therapie

Zwei herztransplantierte Patienten dieser Studie, Patient Z-N. und Patient L. wurden mit der konventionellen immunsuppressiven Therapie bestehend aus Azathioprin, Prednison und Antithymozytenglobulin (ATG) behandelt.

1. Fallbeschreibung Patient Z-N.

a) Klinische Ergebnisse

Bei dem Patienten Z-N. (männlich, 39 Jahre) wurde am 7.5.1981 am Deutschen Herzzentrum in München eine orthotope HTP durchgeführt (106). Die Indikation zur Operation stellte sich auf dem Boden einer Koronaren Herzkrankheit. Dem Patienten wurde das Organ eines 25-jährigen männlichen Unfallopfers transplantiert. Der unmittelbare postoperative Verlauf war komplikationslos. In der 5. bzw. 8. Woche p.o. ließen sich gesichert durch die EMB eine leichte bzw. mittelschwere AR nachweisen. Die 2. Transplantatreaktion war begleitet von einer Zytomegalie-Virusinfektion. Der Patient wurde 2 mal aufgrund einer Magen- bzw. Darmperforation (am 77. und 102. Tag

p.o.) laparotomiert. Daraufhin erfolgte am 80. Tag p.p. die Umstellung der Immunsuppression auf CsA und niedrig dosiertes Prednison. Nach der Entlassung aus dem Krankenhaus befand sich der Patient in einem guten Allgemeinzustand, erlag aber 4 Jahre p.o. einer Pneumonie, ausgelöst durch eine schwere Immundefizienz.

b) Korrelation ATG-Therapie mit Rosetten-Test bzw. Absolutzahlen der T-Lymphozyten

Die Prozentzahlen der Rosetten-positiven T-Lymphozyten schwankten unter der anfänglich niedrigen ATG-Dosierung von 3 mg/kg KG um Werte von 10% (Abb.9). Die Erhöhung der ATG-Dosis auf 12 mg/kg KG am 8. Tag p.o. führte zu Rosettenwerten von unter 5%. Im weiteren Verlauf wurde die ATG-Dosis entsprechend den Rosettenwerten eingestellt. Entsprechendes galt für die Absolutzahlen von T-Lymphozyten, welche sich aus der Gesamtzahl der Lymphozyten und dem Prozentsatz an Rosetten-positiven Zellen errechneten. (Abb.2).Intermittierendes 2-tägiges Verabreichen von ATG ab dem 26. Tag p.o. resultierte in einem Anstieg der Rosettenwerte auf 8%. Durch gleichzeitig durchgeführte EMB ließen sich Zeichen einer leichten AR nachweisen. Die kontinuierliche tägliche Applikation von ATG führte zu einem Ab-

sinken der Rosettenwerte und zu gebesserten Biopsiebefunden. Durch das Absetzen von ATG ab der 7. Woche p.o. zeigte sich wieder ein deutlicher Anstieg der T-Lymphozytenzahl um das 8-fache. Die EMB zeigte in dieser Zeit Befunde einer mittelschweren AR. Nachdem ab dem 48. Tag p.o. ATG erneut eingesetzt wurde, fielen die T-Lymphozyten wieder auf gewünschte Werte ab. Kontrollbiopsiebefunde bestätigten den Erfolg der AR-Therapie. Vollständiges Absetzen von ATG ab dem 56. Tag p.o. führte zu deutlich höheren Rosettenwerten, aber zu keiner erneuten AR mehr.

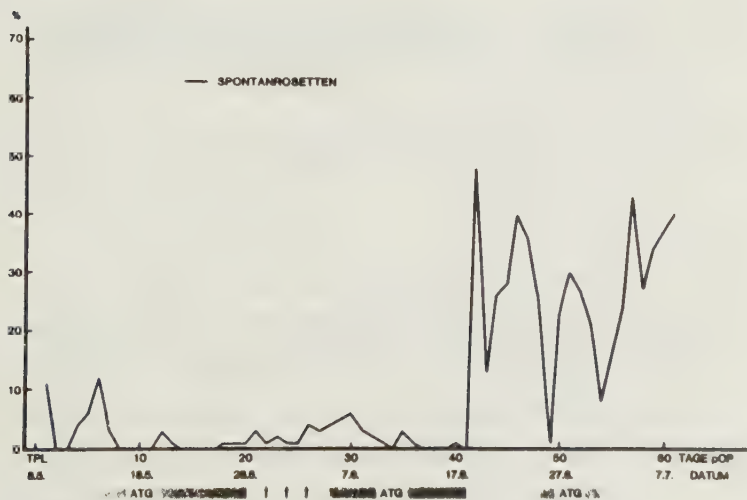


Abb.9: Postoperativer Verlauf der Prozentzahlen an Rosettenpositiven T-Zellen im mononukleären Konzentrat bei Patient Z-N.

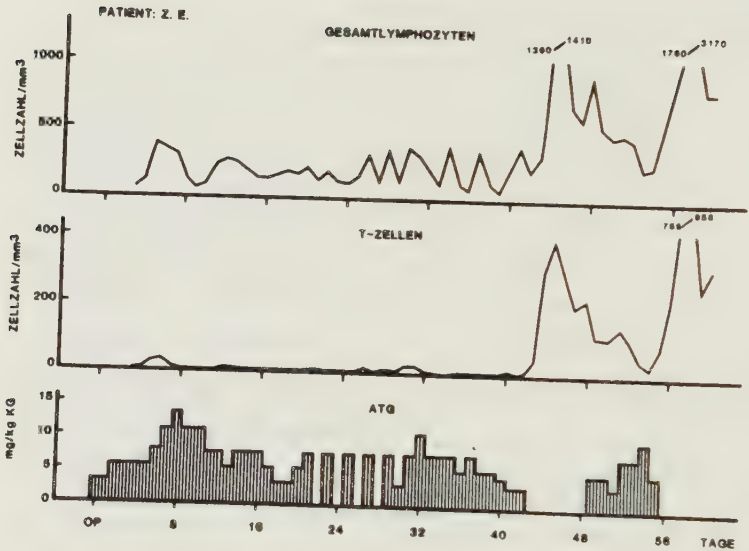


Abb.10: Postoperativer Verlauf der Absolutzahlen für Gesamt- und T-Lymphozyten in Relation zur ATG-Dosis bei Patient Z-N.

c) Vergleich Rosetten-Test und McAb OKT3

Durch OKT3 markierte T-Lymphozyten erreichten im mononukleären Konzentrat keine Werte über 20% unter der ATG-Therapie (Abb.11). Die Prozentzahlen der durch OKT3 gekennzeichneten Zellen waren durchwegs um 50% - 80% höher als die gemessenen Rosettenwerte. Sie folgten im Kurvenverlauf den Ergebnissen des Rosetten-Tests.

Jeweils nach dem Absetzen der ATG-Therapie ab dem 43. und 55. Tag p.o. stiegen die Prozentzahlen von OKT3 auf Werte bis zu 55% an.

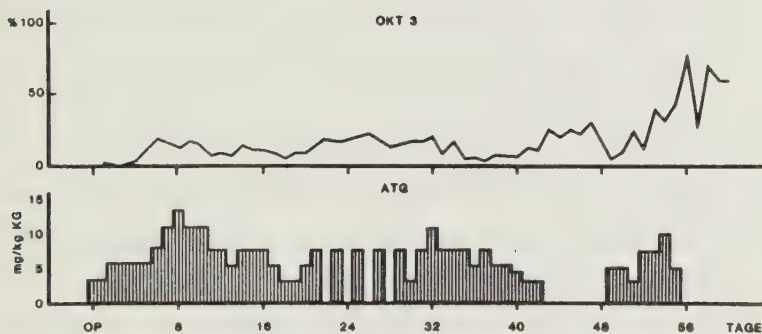


Abb.11: Postoperativer Verlauf der Prozentzahlen der durch OKT3 markierten T-Lymphozyten in Relation zur ATG-Dosis bei Patient Z-N.

2. Fallbeschreibung Patient L.

a) Klinische Ergebnisse

Bei dem Patienten L. (männlich, 32 Jahre) wurde am 19.8.1981 im Klinikum Großhadern eine orthotope HTP durchgeführt (10). Die präoperative Diagnose lautete koronare Herzkrankheit. Bei dem Spender handelte es sich um ein 26-jähriges, männliches Unfallopfer. Der unmittelbare postoperative Verlauf war zufriedenstellend. Es wurden 2 AR diagnostiziert, jeweils zwischen dem 6. und 15. und dem 22. und 34. Tag p.o.. Am 27. Tag p.o. fanden sich in der Abdomenübersichtsaufnahme Luft-sicheln unter dem Zwerchfell. Ursache dafür war keine Perforation im Magen-Darm-Trakt, sondern eine Pneumato-sis cystoides intestinii-Infektion. Aufgrund dieser Befunde wurde die konventionelle Therapie auf CsA zusammen mit niedrig dosiertem Prednison umgestellt. Der weitere postoperative Verlauf war komplikationslos und der Patient befindet sich zum Zeitpunkt der Zusammenstellung dieser Studie in einem sehr guten Allgemeinzustand.

b) Korrelation ATG-Therapie mit Rosetten-Test bzw. mit den Absolutzahlen der T-Lymphozyten

Der Verlauf der Rosetten-positiven T-Lymphozyten zeigt postoperativ unter der anfänglich sehr niedrigen ATG-Therapie (0,4 mg/kg KG) starke Schwankungen mit Werten

bis zu 30% (Abb.12). Am 6. Tag p.o. wurde bioptisch eine Abstoßungsreaktion diagnostiziert. Die Erhöhung der ATG-Dosierung auf 4 mg/kg KG führte zu einem Absinken der Rosettenwerte auf unter 10%. Eine 2. AR am 22. Tag p.o. war von einem hohen Anteil an Rosetten-positiven Zellen bis zu 45% begleitet. Eine erneute Steigerung der ATG-Dosis auf 10 mg/kg KG supprimierte die T-Lymphozyten auf unter 10%. Die Umstellung der ATG-Therapie auf CsA am 27. Tag p.o. resultiert in einem deutlichen Anstieg der Rosettenzahlen auf Werte zwischen 20 und 60% (Abb.13). Entsprechend verhielten sich die errechneten T-Lymphozytenzahlen, die unter ATG-Therapie nur während Transplantatreaktionen Werte über 200 Zellen/mm³ erreichten.

c) Vergleich Rosetten-Test und monoklonaler Antikörper
OKT3

Der Prozentsatz der durch OKT3 markierten T-Lymphozyten zeigt im Verlauf eine gute Übereinstimmung mit den Rosettenwerten (Abb.14). Auch in diesem Fall erreichten die Prozentzahlen erst unter der Dosiserhöhung von ATG nach dem 8. bzw. nach dem 22. Tag p.o. Werte unter 10%. Ähnlich wie bei Patient Z-N. waren die Werte von OKT3 unter konventioneller Therapie durchschnittlich 40-60% höher als die Zahl der durch Schafserythrozyten⁸ mar-

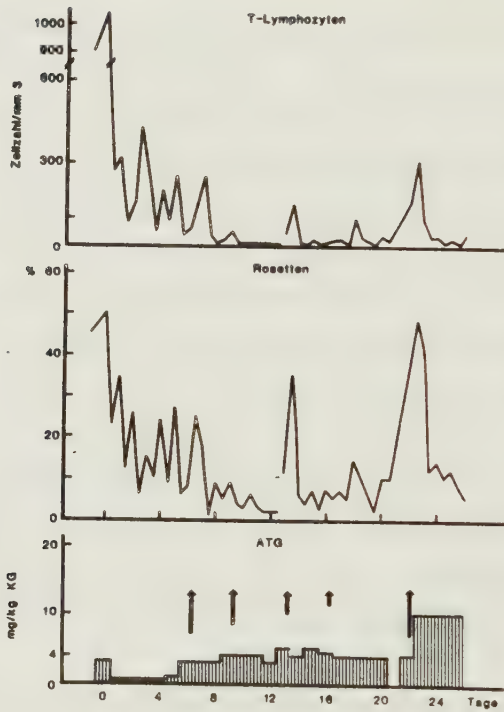


Abb.12: Postoperativer Verlauf der Prozentzahlen von Rosetten-positiven T-Zellen bzw. der Absolutzahlen von T-Lymphozyten in Abhängigkeit von der ATG-Dosis bei Patient L.

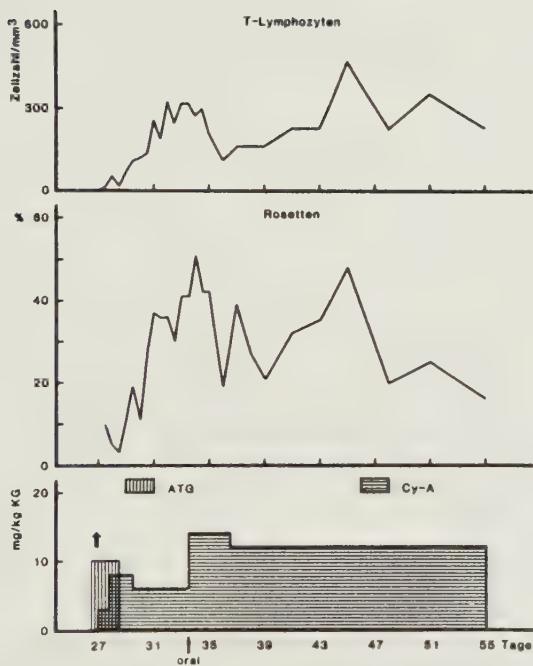


Abb. 13: Postoperativer Verlauf der Prozentzahlen von Rosetten-positiven Zellen und Absolutzahlen der T-Lymphozyten unter Ciclosporin Therapie bei Patient L.

kierten Zellen. Nach der Umstellung auf CsA wurden kontinuierlich Werte um 30% erreicht (Abb.15).

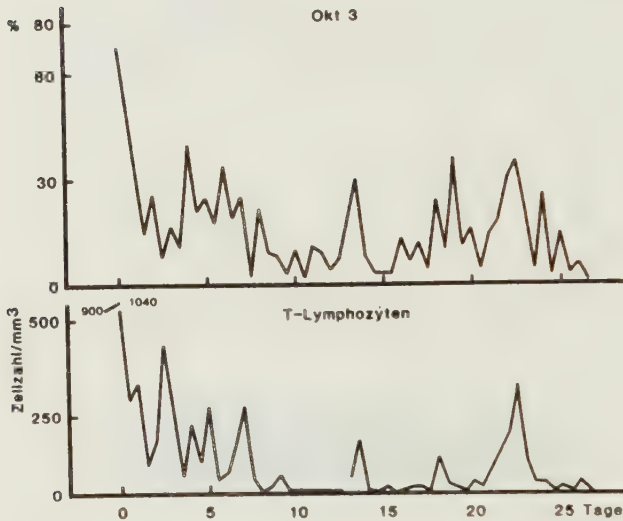


Abb.14: Postoperativer Verlauf der Prozentzahlen der durch OKT3 markierten T-Lymphozyten unter ATG-Therapie bei Patient L.

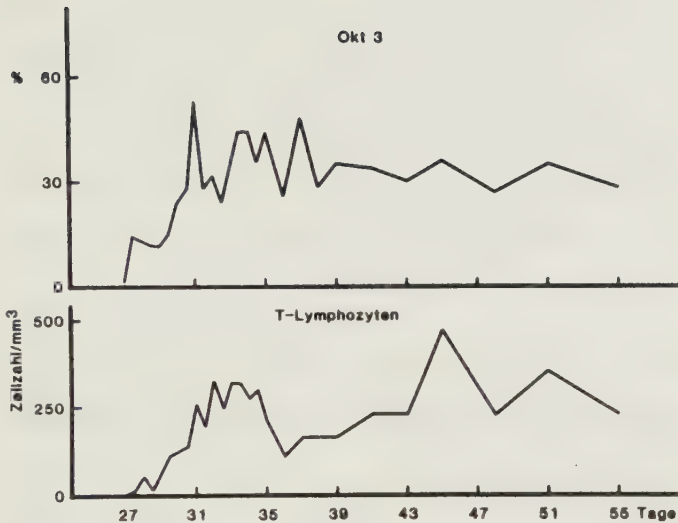


Abb.15: Postoperativer Verlauf der Prozentzahlen der durch OKT3 markierten T-Lymphozyten unter Ciclosporin-Therapie bei Patient L.

3. Sensitivität des Rosetten-Tests bezüglich Abstoßungsreaktionen

Unter konventioneller Therapie traten bei beiden Patienten nur AR auf, die durch Anstiege der Rosettenwerte um mehr als 100% gekennzeichnet waren. Die beschriebenen Veränderungen dieser Werte waren bei beiden Patienten mindestens 2 bis maximal 8 Tage vor den ersten Zeichen einer Trans-

plantatreaktion in der EMB zu sehen (Tab.I).

Tabelle I: Tage des Anstiegs der Rosettenwerte vor der Verifizierung der AR in der EMB

Patient	1.AR	2.AR
Z-N.	6.Tg	8.Tg
L.	5.Tg	2.Tg.

II. Ergebnisse unter Ciclosporin Therapie

1. Klinische Ergebnisse

10 Patienten wurden vom Zeitpunkt der HTP an mit CsA und niedrigen Dosierungen von Prednison behandelt (Tab.II)

Patienten	Geschlecht	Grundkrankheit	Transplantation	Alter	p.o.Verlauf
1. M.M.	m	KMP	21.7.82	43	lebt
2. G.W.	m	KHK	8.8.82	44	"
3. R.C.	w	M. Uhl	13.8.82	20	+ 10 hp.o.
4. K.H.	m	KHK	3.12.82	37	+ 2,5 Jahre p.o.
5. R.R.	m	KMP	4.1.83	33	+ 73.Tg.p.o.
6. S.K.	m	pulm. Hypertension	14.2.83	24	+ 10.Tg.p.o.
7. W.A.	m	KMP	31.3.83	43	lebt
8. V.L.	m	KHK	24.4.83	41	"
9. U.B.	m	KMP	18.5.83	43	"
10. S.H.	m	KMP	7.7.83	45	"

m=männlich; w=weiblich; KMP=dilatative Kardiomyopathie; KHK=Koronare Herzkrankheit.

Tabelle II: Zusammenstellung der herztransplantierten Patienten von Juli 1982 bis Juli 1983 unter Ciclosporin Therapie.

a) Geschlechts- und Altersverteilung der transplantierten Patienten

In dieser Gruppe befanden sich 9 männliche und 1 weibliche Patientin im Alter von 20 bis 45 Jahren (im Mittel 36,4 Jahre). Das Alter der verfügbaren Organspender lag zwischen 18 und 37 Jahren (im Mittel 25,3 Jahre).

b) Grundkrankheiten

4 Patienten dieser Gruppe waren präoperativ an einer Koronaren Herzkrankheit, 3 Patienten an einer kongestiven Kardiomyopathie und 1 Patient an einer alkoholtoxisch bedingten Kardiomyopathie erkrankt. 1 Patientin litt präoperativ an dem seltenen Morbus Uhl, einer degenerativen Erkrankung der rechten Ventrikelwand (Abb.16). Neben diesen 9 herztransplantierten Patienten diagnostizierte man bei einem weiteren Patienten einen primären pulmonalen Hypertonus. Bei diesem Patienten wurde eine Herz- und Lungentransplantation vorgenommen.

c) Operative Komplikationen

Bei 7 von 10 Patienten fand sowohl die Spenderherzextplantation als auch die Implantation im Klinikum Großhadern statt. Für 3 Patienten wurde das Spenderherz in auswärtigen Kliniken (Hannover, Wien, Graz) entnommen (Ischämiezeit: 195 min, 182 min und 171 min).



Abb.16: Morbus Uhl: Bindegewebige Degeneration der rechten Ventrikelwand

Alle Patienten konnten in zufriedenstellendem Allgemeinzustand auf die Intensivstation verlegt werden. 1 Patient starb 10 Stunden nach HTP an Kammerflimmern. Die Sektion ergab eine diffuse Fibrosierung des Spenderherzens (Abb.17).

d) Abstoßungsreaktionen

Im Beobachtungszeitraum von 100 Tagen nach HTP waren bei den Patienten der CsA Gruppe 18 AR zu verzeichnen. Die

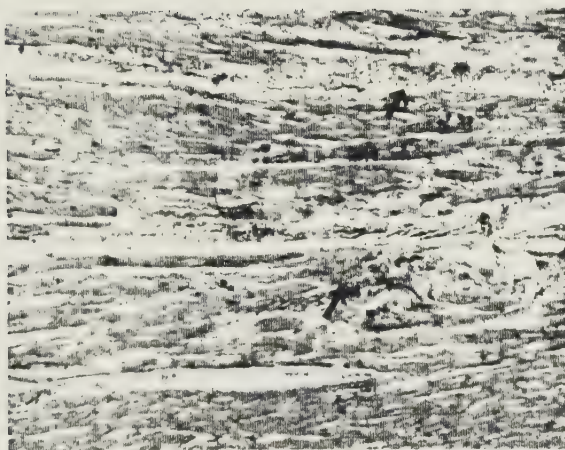


Abb.17: Deutlich sichtbare Fibrosierung des Spenderherzens bei Patient R.C. (van Gieson Färbung)

Dauer der Transplantatreaktionen wurde definiert vom Tage der 1. positiven EMB bis zum Tag der 1. rückläufigen Biopsie, wobei die Dauer von 2 - 14 Tagen (im Mittel 5,5 Tage) variierte (Abb.18).

AR traten zwischen dem 3. und 98. Tag p.o. auf. Eine deutliche Häufung der Reaktionen zwischen dem 3. und 20. postoperativen Tag (6 Patienten) ist erkennbar. (Abb. 18). 17 dieser AR konnten erfolgreich mit Methylpred-

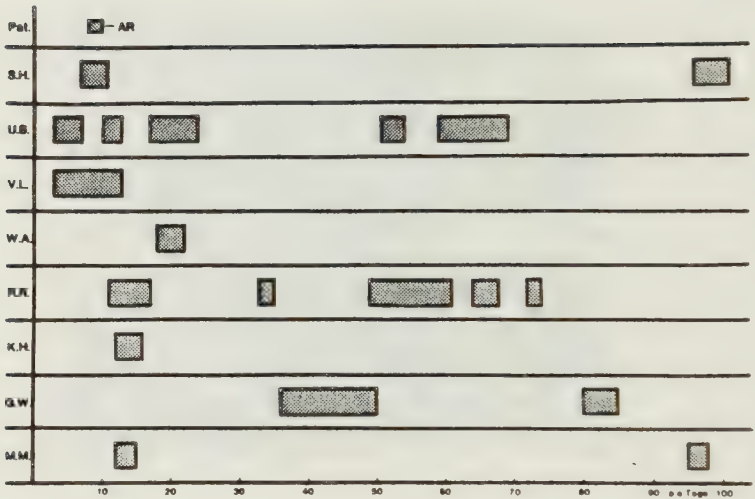


Abb.18: Zeitliches Auftreten der Abstoßungsreaktionen bei den untersuchten Patienten

nisolon in einer Dosis von 3×1 g/die behandelt werden. Ein Patient verstarb am 73. Tag p.o. an einer irreversiblen AR, welche durch die Biopsie nicht eindeutig verifiziert werden konnte und bei der deshalb keine Abstoßungstherapie eingeleitet wurde.

e) Virusinfektionen

Es erkrankten 3 Patienten nach HTP an VI.

- A. Patient K.H. litt ab dem 45. Tag p.o. an einer zunehmenden Abgeschlagenheit, begleitet von Temperaturerhöhung und einer Oesophagitis. Eine VI wurde durch eine Herpes simplex KBR mit Titern von 2:256 bestätigt. Trotz Therapie mit Azyklovir dauerte die Infektion bis zum 65. Tag p.o. an.
- B. Patient M.M. entwickelte in der 3. Woche einen koma-tösen Zustand mit Temperaturerhöhung. Aufgrund einer begleitenden Stomatitis aphtosa und einer Herpes simplex KBR mit Titern von 1:264 wurde die Diagnose einer Herpes Virus Meningitis gestellt. Ein weiterer pathologischer mikrobiologischer Befund lag nicht vor.
- C. Patient U.B. litt zwischen dem 44. und 50. Tag p.o. an einer starken Diarrhoe mit Temperaturerhöhung. Unter Immunglobulin- und symptomatischer Therapie besserte sich der Zustand des Patienten rasch. Retrospektiv stellte man die Diagnose einer viral verursachten Enteritis (KBR Titer für Herpes simplex Virus: 1:166).

f) Infektionen nichtviraler Genese

A. Pankreatitis

Patient W.A. zeigte vom 3. bis 9., 11. bis 16. und 58. bis 69. Tag p.o. mehrere Schübe einer akuten rezidivierenden und nekrotisierenden Pankreatitis mit Lipase- und Amylasewerten im Serum jeweils bis zu 1400 U/l. Unter O-Diät und anschließender Pankreasschon-

kost stabilisierte sich der Zustand des Patienten wieder.

B. Reaktivierte pulmonale Tuberkulose

Patient V.L. litt ab dem 38. Tag p.o. unter Temperaturerhöhungen, Abgeschlagenheit und Nachtschweiß. Die Röntgenthorax-Übersichtsaufnahme zeigte Weichteilverschattungen im rechten Lungenoberlappen. Dieser Befund wurde später mit Hilfe der Ergebnisse des Mikrobiologischen Institutes als Reaktivierung einer pulmonalen Tuberkulose diagnostiziert. Der Patient wurde entsprechend tuberkulostatisch mit Isoniazid, Ethambutol und Streptomycin behandelt.

C. Legionella Pneumonie

Patient G.W. entwickelte um den 53. Tag p.o. starkes Fieber mit Temperaturen um 39,5°C. In der Röntgenthoraxaufnahme fand sich eine rechtsbasale Pneumonie, welche auf Antibiotikagaben mit Cephalosporinen nicht ansprach. Etwas verzögert eingetroffene Titer-Verläufe für die einzelnen Serotypen der Legionellose waren mit Werten von über 1:2000 hoch pathologisch. Nach Gabe von Rifampicin und Erythromycin sank die Körpertemperatur. Das Röntgenbild klarte zunehmend auf und zeigte nach dem 70. Tag p.o. eine Restitutio ad integrum.

g) Postoperatives Organversagen

3 der 10 Patienten benötigten aufgrund von Kreatininwerten

bis zu 9,5 mg% eine intermittierende Hämodialyse bis zu 30 Tage p.o. Bei allen Patienten konnten die Nieren nach diesem Zeitraum ihre Funktion wieder voll übernehmen. Ein Patient, bei dem eine Herz- und Lungentransplantation vorgenommen wurde, starb 10 Tage nach Operation an einem Multiorganversagen mit akuter gelber Leberdystrophie.

h) Langzeitergebnisse der transplantierten Patienten

Nach HTP verstarben 3 Patienten in der Akutphase nach der Operation: Patient R.C. aufgrund einer Fibrosierung des Spenderherzens (10 Stunden p.o.), Patient S.K. (10 Tage p.o.) infolge einer akuten gelben Leberdystrophie und Patient R.R. infolge einer akuten fulminanten AR (am 73. Tag p.o.). Zwei der untersuchten Patienten befinden sich zum Zeitpunkt dieser Studie mehr als 3 Jahre, und 4 Patienten mehr als 2 Jahre nach HTP in gutem Allgemeinzustand. Patient K.H. verstarb 2,5 Jahre p.o. an einer schweren Sepsis. Dieser Patient wurde 4 Monate vor seinem Tod von Ciclosporin auf Azathioprin Medikation umgestellt.

2. Experimentelle Ergebnisse

a) Veränderungen im peripheren Blut während Abstoßungsreaktionen nach orthotoper HTP

α) Quantitative Veränderungen der Leukozyten- und Lymphozytenzahlen vor und während Abstoßungsreaktionen.

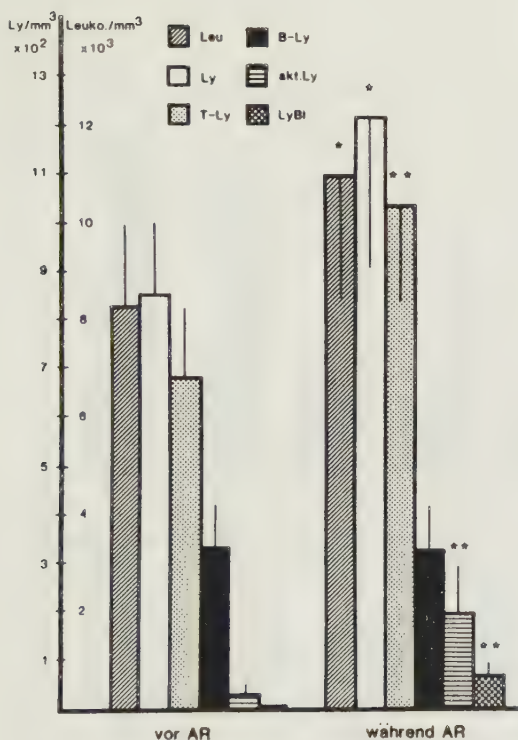
Abb. 19 zeigt im Vergleich die Mittelwerte der verschiedenen Zellzahlen der untersuchten Patienten ohne und mit sichtbaren Zeichen einer AR in der EMB.

Die Leukozytenzahlen stiegen während AR um 25% ($p < 0,005$) und die Gesamtlymphozyten um 44% ($p < 0,005$) an. Am deutlichsten sichtbar wurde der Anstieg der T-Lymphozyten um durchschnittlich 52% ($p < 0,0005$). Im Vergleich dazu blieb die Absolutzahl der B-Lymphozyten nahezu konstant.

Entscheidender Parameter war die deutliche Zunahme der aktivierten Lymphozyten um mehr als 400% ($p < 0,0005$) und das Auftreten von Lymphoblasten während Transplantatreaktionen.

β) Auftreten aktivierter Lymphozyten und Lymphoblasten vor und während Abstoßungsreaktionen.

Das zeitliche Auftreten der Aktivierung der mononukleären Zellen vor den 18 nachgewiesenen AR wurde in Abb. 20 dargestellt. In 4 Fällen war die Aktivierung der Lymphozyten 4 Tage, in 7 Fällen 3 Tage, in 10 Fällen 2 Tage und in 17 der 18 Fälle mindestens 1 Tag vor den ersten Zeichen einer AR in der EMB zu sehen



.19: Absolutzahlen von Leukozyten, Gesamt-, T- und B-Lymphozyten und Lymphoblasten vor und während AR

Alle 18 Transplantatreaktionen waren spätestens am Tage der ersten positiven Biopsie begleitet von einer Aktivierung innerhalb des mononukleären Zellbildes. Es ist ein kontinuierlicher Anstieg dieser Zellen bis zum Tage der nachgewiesenen AR zu verzeichnen. Zu diesem Zeitpunkt erreichten die aktivierten Lymphozyten Werte von 185 Zellen/mm³ und die Lymphoblasten Werte von 55 Zellen/mm³ im Mittel.

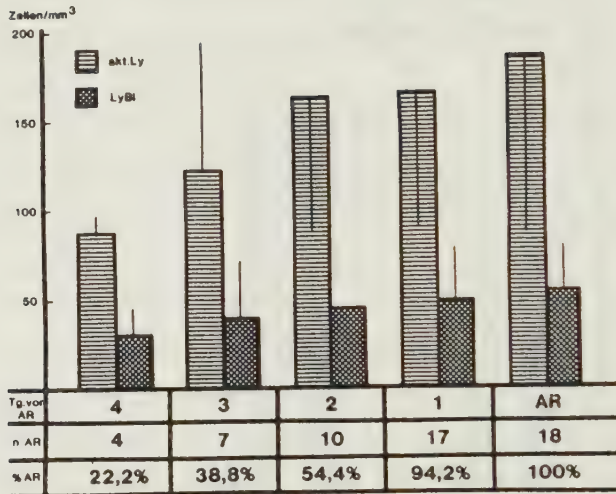


Abb.20: Absolutzahlen der aktivierten Lymphozyten und Lymphoblasten an den jeweiligen Tagen vor den ersten Zeichen einer Transplantatreaktion in der Myokardbiopsie. Aus der Tabelle darunter ist ersichtlich, zu welchem Zeitpunkt aktivierte Zellen im mononukleären Konzentrat vor den ersten pathologischen Biopsieergebnissen sichtbar waren.

Vergleichend dazu zeigt Abb.21 die Prozentzahl der aktivierten Lymphozyten bzw. Lymphoblasten von jeweils 100 Lymphozyten. In der Tendenz sind ähnliche Befunde wie in Abb. 20 zu sehen. Der Tag, an dem durch die EMB eine AR diagnostiziert wurde, war begleitet von Prozent-

zahlen von durchschnittlich 13,8 aktivierten Lymphozyten und 4,5 Lymphoblasten/100 Lymphozyten.

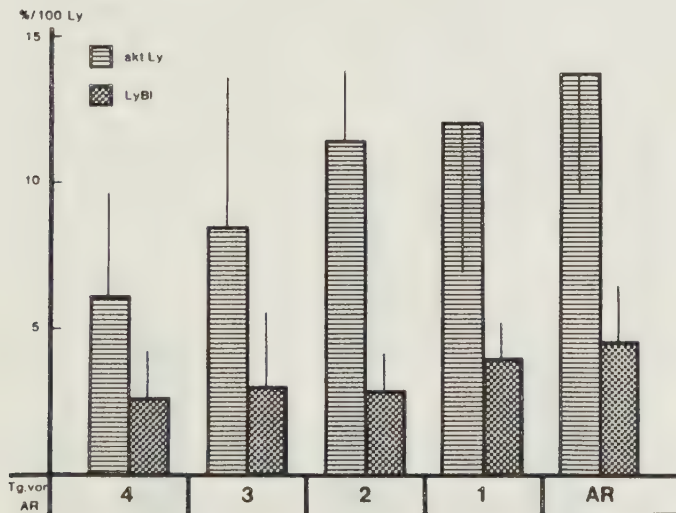


Abb.21: Prozentzahlen von aktivierten Lymphozyten und Lymphoblasten/100 Lymphozyten an Tagen vor den ersten Zeichen einer Transplantatreaktion in der Myokardbiopsie

8) Verschiebungen innerhalb der Lymphozytensubpopulationen.

Das Verhältnis von B- zu T-Lymphozyten änderte sich während AR signifikant. Dieser Quotient stieg zugunsten der T-Lymphozyten von 2,09 auf 3,77 ($p < 0,005$)

an. Nach Therapie mit Methylprednisolon fiel er wieder auf 2,28 zurück. Das Verhältnis von OKT4-positiven Helferzellen zu OKT8-positiven Suppressorzellen fiel nicht signifikant während AR ab ($p < 0,1$). Alle Zahlenangaben sind Mittelwerte.

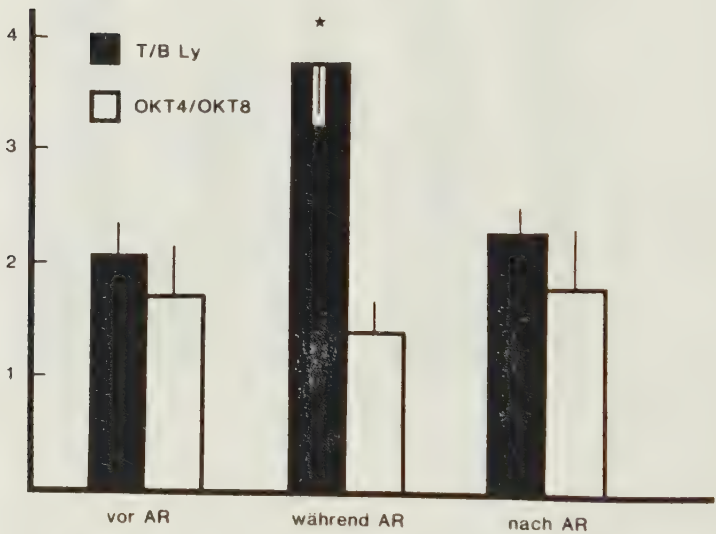


Abb.22: Verhältnis von T- zu B-Lymphozytenzahlen bzw. OKT4 zu OKT8 vor und während Abstoßungsreaktionen und nach Methylprednisolontherapie.

δ) Einfluß von Methylprednisolon auf Absolutzahlen der Lymphozyten.

In Abb.23 wurden die durchschnittlichen Zellzahlen der Patienten während AR aufgezeichnet. Als Vergleich dienen die Werte nach Beendigung der Abstoßungstherapie mit Methylprednisolon. Sowohl Gesamt- als auch T-Lymphozyten fielen nach abgeschlossener Therapie um 66% ab ($p < 0,0005$). Die Zahl der B-Lymphozyten reduzierte sich weniger signifikant um 53% ($p < 0,005$). Um 90% fiel die Zahl der aktivierten Lymphozyten. Die Lymphozyten verschwanden nach Methylprednisolontherapie aus dem mononukleären Zellbild innerhalb von 48 Stunden.

ε) Fallbeschreibung von Abstoßungsreaktionen an Patient R.R.

Patient R.R. (männlich, 37 Jahre), wurde am 3.2.83 aufgrund einer Kardiomyopathie im Endstadium transplantiert. Es traten 3 myokardbioptisch gesicherte AR auf:

1. Zwischen dem 11. und 18. Tag, um den 34. Tag und zwischen dem 49. und 61. Tag p.o.. Die wesentlichen Veränderungen im Rahmen des ZIM sind am Verlauf der aktivierten Lymphozyten und Lymphoblasten zu sehen (Abb.24). Zum Zeitpunkt der jeweiligen AR erreichten die Zellen Werte von 40 - 90 Lymphoblasten/mm³ und 150 - 250 aktivierten Lymphozyten/mm³. Kurz vor dem Exitus des Patienten am 73. Tag p.o. konnte ein 4. Anstieg dieser Zellen bis zu 220 Lymphoblasten und 500 aktivierten Zellen/mm³

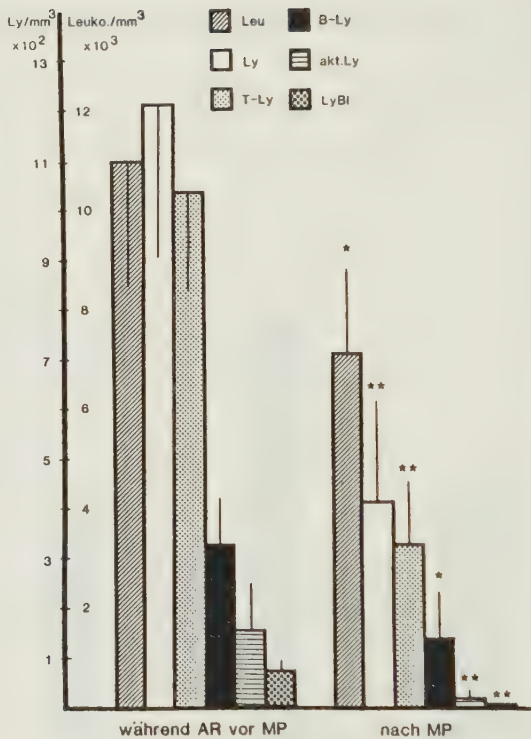


Abb.23: Absolutzahlen von Gesamt-, T- und B.Lymphozyten, aktivierter Lymphozyten und Lymphoblasten vor und nach Methylprednisolon-Therapie

registriert werden. Das Diagramm der Leukozyten, Gesamt- und T-Lymphozyten folgt diesem Kurvenverlauf weniger deutlich. Die EMB zum Zeitpunkt des 4. Gipfels der aktivierten Zellen zeigte keine Zeichen einer Transplantatreaktion. Am 73. Tag p.o. verstarb der Patient an einer

autoptisch gesicherten schweren AR. Die Sektion verifiziert, daß subendokardial an den biopsierten Stellen vor allem Narbengewebe ohne Zellinfiltrationen zu erkennen war, aber das restliche Myokard faßt vollständig zerstört war durch die Inflammation.

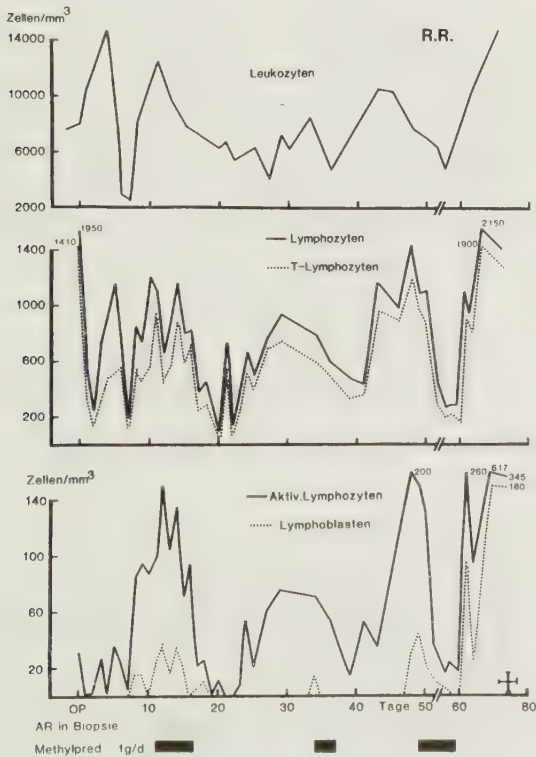


Abb.24: Postoperativer Verlauf der Leukozyten, Gesamt- und T-Lymphozyten, aktivierten Lymphozyten und Lymphoblasten bei Patient R.R. unter Berücksichtigung der Dauer von Abstoßungskrisen sowie der durchgeführten Methylprednisolon-Therapie.

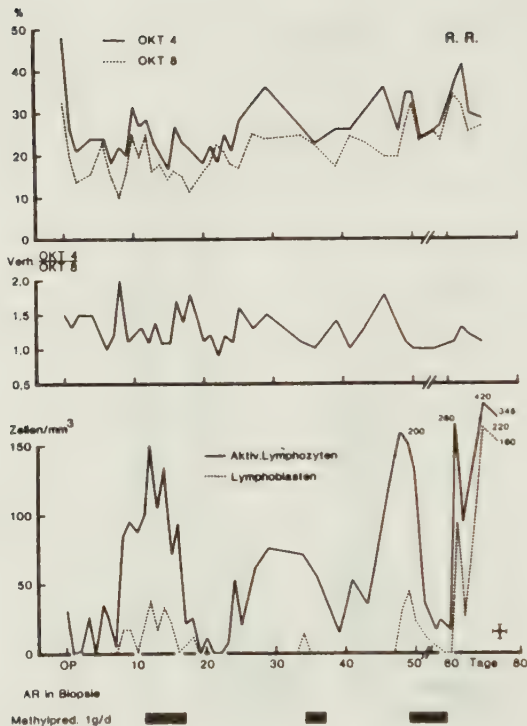


Abb.25: Postoperativer Verlauf der Prozentzahlen für OKT4- bzw. OKT8-positiven Zellen, Quotient OKT4 zu OKT8 und der Absolutzahlen der aktivierten Lymphozyten bei Patient R.R.

Der Verlauf der OKT4-positiven Helferzellen und OKT8-positiven Suppressor- und zytotoxischen Zellen zeigt keine Abhängigkeit zu den jeweiligen AR (Abb.25). Bei diesem Patienten war ein durchwegs eher niedriger Quotient von OKT4

zu OKT8 zu sehen.

b) Virusinfektionen

α) Quantitative Veränderungen der Leukozyten, Gesamtlymphozyten und Lymphozytensubpopulationen vor und während Virusinfektionen.

Zusammengefaßt sind auf Abb.26 die Durchschnittswerte der Zellzahlen von den 3 Patienten mit nachgewiesener VI vor und während manifester Infektion. Die Gesamtleukozytenzahl fällt um ca. 15% während VI ab. Die Gesamtlymphozyten und T-Lymphozyten steigen um 44% bzw. 52% ($p < 0,05$). Die B-Lymphozytenzahlen ändern sich nicht signifikant.

Erneut war als Hauptbefund die Zunahme der aktivierten Lymphozyten um 300% ($p < 0,005$) und das Auftreten von Lymphoblasten mit einer Zellzahl von 30 Lymphoblasten/mm³ zu verzeichnen. Bei allen angegebenen Zahlen handelt es sich um Mittelwerte.

β) Verschiebungen innerhalb der Lymphozytensubpopulationen.

Der Quotient von T- zu B-Lymphozyten änderte sich während Virusinfektionen kaum. Statistisch signifikant hingegen ($p < 0,025$) verschob sich das Verhältnis der OKT4-positiven Helferzellen zu den OKT8-positiven Suppressor/zytotoxischen Zellen. Dieser Quotient betrug bei den untersuchten Patienten 1,55 vor Virusinfektion und

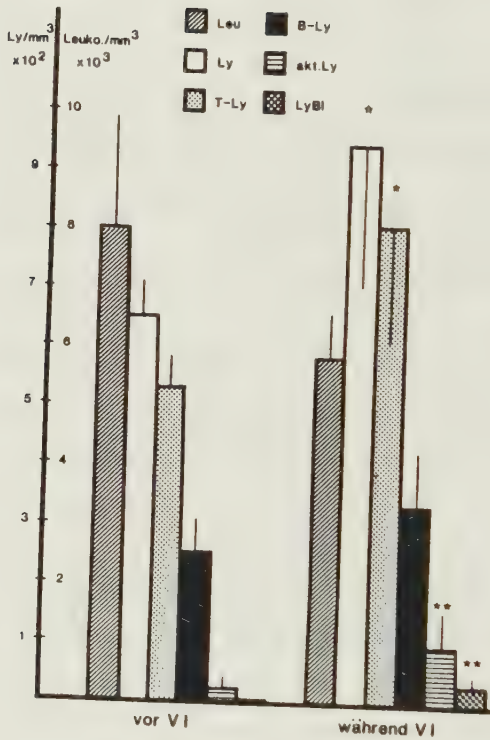


Abb.26: Absolutzahlen der Leukozyten, Gesamt-, T- und B-Lymphozyten, sowie der aktivierten Lymphozyten und Lymphoblasten vor und während Virusinfektionen.

fiel auf Werte von 0,71 während VI ab (Abb.27).

γ) Fallbeschreibung einer Virusinfektion an Patient K.H.
Patient K.H. (männlich, 37 Jahre) wurde am 3.12.82 aufgrund

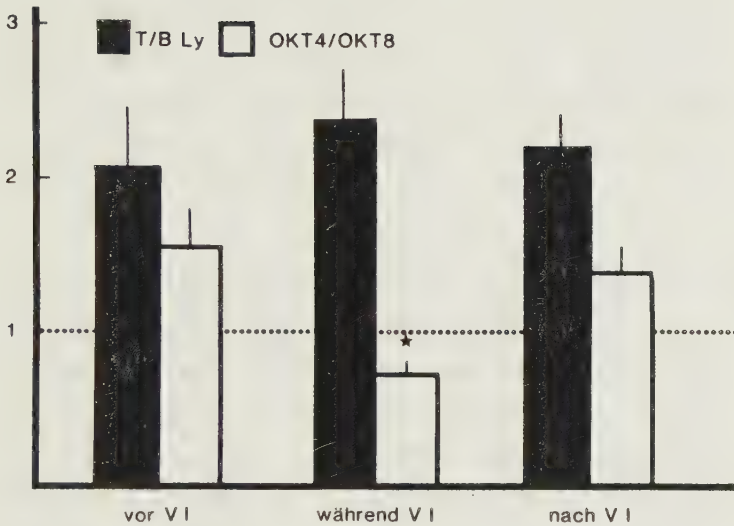


Abb.27: Verhältnis von T- zu B-Lymphozyten bzw. von Helfer- zu Suppressorzellen (OKT4 zu OKT8) vor und während Virusinfektionen

einer koronaren Herzkrankheit transplantiert. Zwischen dem 12. und 19. Tag p.o. trat eine bioptische gesicherte AR auf. Begleitet war diese Reaktion von einem Anstieg der aktivierten Lymphozyten bzw. Lymphoblasten im ZIM auf Werte von 250 bzw. 90 Zellen/mm³. Dieser Gipfel war unter Therapie mit Methylprednisolon deutlich rückläufig, wie auch die Gesamtzahl der Lymphozyten. Ab dem 47. Tag p.o. nahm die Aktivierung im peripheren Zellbild wieder deutlich zu; Werte

bis zu 260 aktivierten Lymphozyten und 100 Lymphoblasten/mm³ traten auf. Gleichzeitig durchgeführte EMB zeigten keinen pathologischen Befund. In diesem Zeitraum wurde serologisch eine Herpes simplex Infektion diagnostiziert (KBR für Herpes simplex Virus: 1:256)

Zum Zeitpunkt der AR zwischen dem 12. und 19. Tag p.o. waren die Prozentzahlen der OKT4 bzw. OKT8-positiven Zellen unter Immunsuppression weitgehend normal (Abb.29). Zum Zeitpunkt der durch die VI bedingten zweiten Aktivierung im ZIM kehrte sich das Verhältnis der Helfer- zu Suppressorzellen um. Ab dem 50. postoperativen Tag fiel dieses Verhältnis auf Werte von 0,7 ab.

c) Zytologische und immunologische Veränderungen bei Pankreatitis

Patient W.A. zeigte wiederholt Schübe einer akuten rezidivierenden Pankreatitis. Parallele Veränderungen im ZIM zeigt Abb.30. Zusammengefaßt sind erneut die Mittelwerte der Zellzahlen des Patienten vor und während klinisch sichtbarer Zeichen einer Pankreatitis. Die Leukozyten und Gesamtlymphozyten stiegen dabei um 88%, die T-Lymphozyten um 105% und die B-Lymphozyten stiegen deutlich um 126%. Pankreatitis-Schübe waren ebenfalls be-

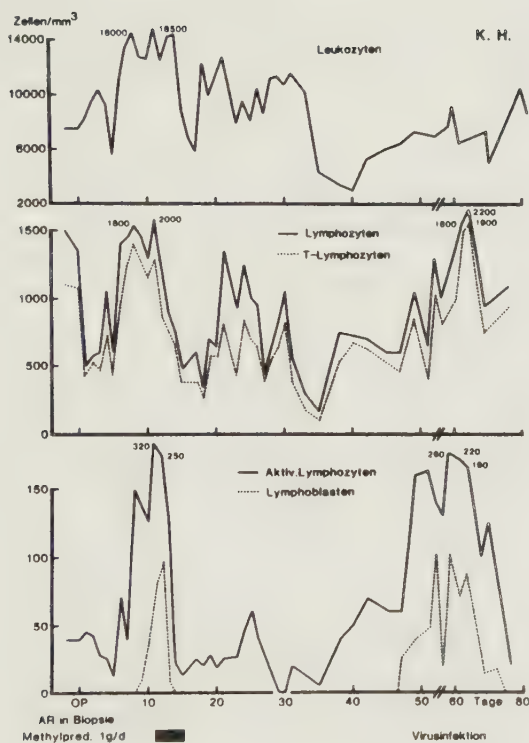


Abb. 28. Postoperativer Verlauf der Absolutzahlen von Leukozyten, Gesamt- und T-Lymphozyten und der aktivierten Lymphozyten und Lymphoblasten bei Patient K.H. unter Berücksichtigung der Abstoßungsreaktionen und der Therapieschübe mit Methylprednisolon

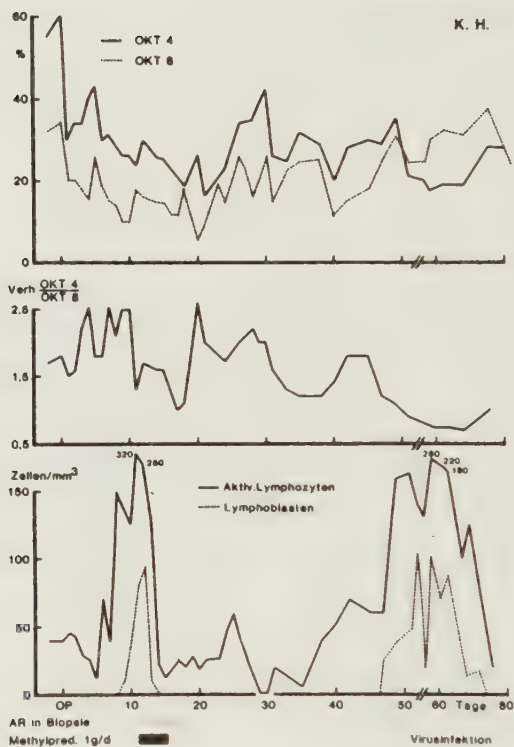


Abb. 29: Postoperativer Verlauf der Prozentzahlen von OKT4 und OKT8 markierten Zellen, Quotient OKT4 zu OKT8 und der Absolutzahlen von aktivierten Lymphozyten und Lymphoblasten bei Patient K.H.

gleitet von einer Aktivierung im ZIM mit Werten von bis zu 140 aktivierten Lymphozyten und 45 Lymphoblasten/mm³.

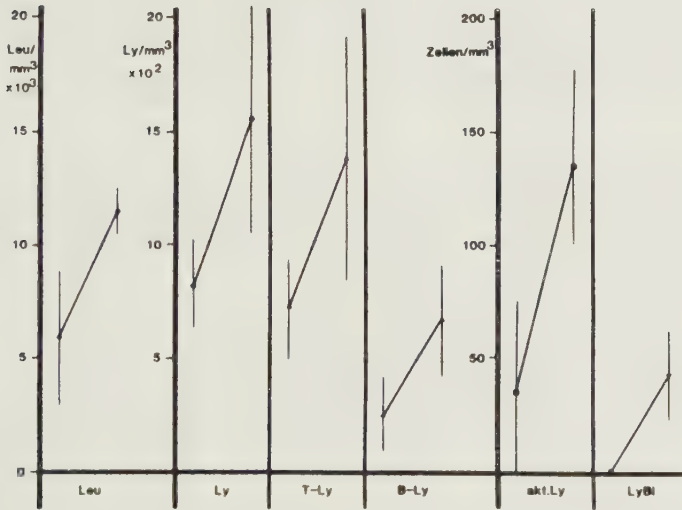


Abb.30: Leukozyten, Gesamt-, T-, B-. aktivierte Lymphozyten und Lymphoblasten vor und während Pankreatitis bei einem Patienten nach HTP

d) Zytologische und immunologische Veränderungen bei pulmonaler Tuberkulose

Eine Aktivierung im Rahmen des ZIM bei Patient V.L. konnte durch eine gleichzeitig ablaufende, reaktivierte pulmonale Tuberkulose erklärt werden. Dabei blieben die

Leukozytenwerte des Patienten nahezu konstant (Abb.31). Die Mittelwerte der Gesamtymphozyten stiegen um 55%, die T-Lymphozyten um 33% und die B-Lymphozyten sehr deutlich um 106%. Der 4,5-fache Anstieg der aktivierten Lymphozyten und das Auftreten von 47 Lymphoblasten/mm³ im Mittel verursachte die Aktivierung innerhalb des mononukleären Zellbildes.

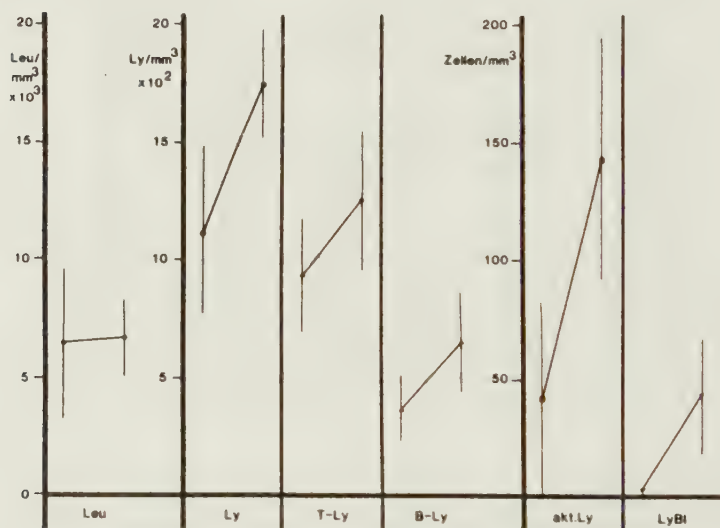


Abb.31: Leukozyten, Gesamt-, T-, B-, aktivierte Lymphozyten und Lymphoblasten vor und während pulmonaler Tuberkulose bei einem Patienten nach HTP

e) Korrelation des durch OKTM markierten Anteils der mononukleären Zellen zur Klinik.

Der McAb OKTM ist gegen Monozyten und Granulozyten des peripheren Blutes gerichtet. Der Verlauf der durch diesen Antikörper gekennzeichneten Zellen zeigte keine Korrelation zu AR oder Infektionen verschiedener Genese.

f) Summarische Gegenüberstellung zyto-immunologisches Monitoring und Endomyokardbiopsie

Patienten	Zytolog. Monitoring n	Biopsien n	Biopsien +	Biopsien -	Biopsien +	Biopsien -	OKT 4 OKT 8 < 1
			Monitoring +	Monitoring -	Monitoring -	Monitoring +	
1 M. M.	13	13	3	8	-	1	1
2 G. W.	17	17	4	11	-	2	-
3 K. H.	13	13	1	9	-	1	2
4 R. R.	16	16	8	8	-	-	-
5 S. K.	3	3	-	3	-	-	-
6 W. A.	14	14	1	7	-	6	-
7 V. L.	15	15	7	5	1	2	-
8 U. B.	15	15	4	3	1	4	3
9 S. H.	5	5	1	2	-	1	1
	111	111	29	56	2	17	7

Abb. 32: Gegenüberstellung von zyto-immunologischem Monitoring und Endomyokardbiopsien bei den einzelnen untersuchten Patienten. Biopsien + = Abstoßungsreaktion, Monitoring + = Aktivierung innerhalb des mononukleären Zellbildes

Bei allen untersuchten Patienten wurden in den ersten 3 Monaten nach HTP insgesamt 111 EMB durchgeführt und im gleichen Zeitraum 410 Tests im Rahmen des ZIM. Die Ergebnisse der EMB und des korrelierenden ZIM wurden verglichen (Abb.32). 31 der 111 EMB waren positiv im Sinne einer AR. Parallel dazu war ohne vorherige Kenntnis des histologischen Biopsieergebnisses das Zellbild des ZIM 29 mal aktiviert. Nur in 2 Fällen waren falsch negative Ergebnisse im ZIM zu verzeichnen. Es handelte sich dabei um ein erneutes Aufflammen einer Transplantatreaktion unter Methylprednisolon-Therapie. Zu diesem Zeitpunkt waren die peripheren Lymphozyten durch das Methylprednisolon in ihrer Anzahl bereits reduziert, die Reaktion am Herzen aber war noch unbeeinflusst. In 24 Fällen war ZIM falsch positiv aktiviert bei gleichzeitig negativer EMB. Wie erwähnt, konnten in 7 Fällen diese falsch positiven Ergebnisse auf VI zurückgeführt werden. Dies konnte im ZIM durch den Quotienten von OKT4 zu OKT8 differentialdiagnostisch von AR abgegrenzt werden. Bei Patient W.A. war die Pankreatitis, bei Patient V.L. die pulmonale Tuberkulose Ursache des falsch positiven ZIM. Bei den übrigen Patienten konnten jeweils kleinere lokal begrenzte Infektionen als Ursachen der Aktivierung des mononukleären Zellbildes angesehen werden. Insgesamt waren die Ergebnisse des ZIM in 111 Fällen 29 mal richtig positiv und 56 mal richtig negativ im

Sinne der Diagnose einer AR (Abb.33). Dies ergibt eine Übereinstimmung von ZIM und EMB in 85,5%. Zwei positive EMB wurden im ZIM nicht bestätigt. Statistisch läßt sich anhand der 4-Felder-Tafel eine Sensitivität des ZIM bezüglich AR von 93,5% errechnen. Die 24 falsch positiven Ergebnisse des ZIM konnten unterteilt werden in 7 Fälle von VI mit einem Verhältnis von OKT4 zu OKT8 deutlich kleiner als 1. Während den 17 Fällen mit nicht viral bedingten Infektionen war der Quotient von OKT4 zu OKT8 größer als 1. Aus diesen Angaben läßt sich statistisch eine Spezifität des ZIM bezüglich Abstoßungsreaktionen von 70% berechnen. Die Vorhersagerichtigkeit des ZIM war bei den untersuchten Patienten 76,6%.

g) Klinische Anwendung des zyto-immunologischen Monitorings

Bei den ersten 8 untersuchten Patienten wurde das ZIM täglich zusätzlich zu anderen Untersuchungen durchgeführt. Routinemäßig entsprechend dem Stanford-Schema wurde die EMB in den ersten 3 Monaten in 6 - 10-tägigen Abständen vorgenommen. Daraus resultierte ein Durchschnitt von 14,7 Biopsien pro Patient bei den ersten 8 Fällen in den ersten 3 Monaten nach HTP.

Nachdem sich die relativ hohe Sensitivität des ZIM bezüglich AR herausstellte, wurde von der Klinik das ZIM

ZYTOLOG. UND IMMUNOLOG. MONITORING

n = 111

BIOPSIE n = 111		Aktivierung	keine Aktivierung
	Abtossung	29	2
	keine Abtossung	17 $\frac{\text{OKT 4}}{\text{OKT 8}} > 1$	56
7 $\frac{\text{OKT 4}}{\text{OKT 8}} < 1$			

Abb. 33: Zyto-immunologisches Monitoring versus Myokardbiopsie

als Indikator für durchzuführende Biopsien akzeptiert. Bei Patient S.H. wurde entsprechend den Ergebnissen im ZIM nur 8 EMB in den ersten 90 Tagen p.o. ausgeführt. Unter Berücksichtigung der Biopsiezahlen der 6 folgenden Patienten ließ sich eine Zahl von 8,4 EMB in den ersten 3 Monaten mitteln. Dies entspricht einer Reduktion der Biopsienzahl mit Hilfe des ZIM um 42,9%.

D DISKUSSION

I Diskussion der Methode

Dem ZIM liegt eine einfache und nichtinvasive Methode zugrunde. Das benötigte Material, 10 ml heparinisiertes Blut, stellt zur täglichen Routinediagnostik von ca. 60 - 80 ml Blut/Tag keine erhebliche Volumenentnahme für den Patienten dar. Der Test kann im Bedarfsfall auch mehrmals täglich durchgeführt werden.

Die ermittelte Gesamtleukozytenzahl und das Differentialblutbild werden durch die Ergebnisse des klinischen Labors kontrolliert. Die anschließende Separation des Blutes über einen Ficoll Isopaque Gradienten führt nicht immer zu einer reinen Isolation eines mononukleären Konzentrates, denn es sind auch polymorphnukleäre Zellen in der Zellseparation enthalten (101). Da das mononukleäre Konzentrat nach der Isolierung gefärbt und differenziert wird, werden die Prozentzahlen der Zellen unter Berücksichtigung der nichtmononukleären Zellen korrigiert.

1. Immunologisches Monitoring nach Herztransplantation unter konventioneller Immunsuppression

Das immunologische Monitoring konventionell therapierter Patienten stellt eine klinisch etablierte Methode dar (8). Dabei erfordert das prozentuale Festhalten der mit Schafs-

erythrozyten rosettenförmig umgebenen T-Lymphozyten keine spezielle Schulung (Abb. 7). Durch die gleichzeitige Verwendung von McAb wird das Ergebnis des Rosetten-Tests durch den Antikörper OKT3, welcher ebenfalls periphere T-Lymphozyten markiert, überprüft. Es hat sich gezeigt, daß unter ATG-Immunsuppression falsch niedrige T-Lymphozytenzahlen im Rosetten-Test auftreten, die mit Hilfe von OKT3 korrigiert werden können.

2. Zyto-immunologisches Monitoring herztransplan- tierter Patienten unter Ciclosporin Therapie

Die Methodik, einschließlich der Isolierung des mononukleären Konzentrates, entspricht dem unter I. diskutierten Verfahren. Bei der Zytozentrifugation des mononukleären Konzentrates ist zu beachten, daß die Zellen auf dem Objektträger gut verteilt sind und nicht zu dicht beieinander liegen. Dies würde eine exakte Differenzierung erschweren. Aus diesem Grund sollten die Präparate vor der Färbung mit dem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung auf ihre Zelldichte überprüft werden.

Die Färbung des mononukleären Konzentrates nach Pappenheim ist unkompliziert. Bei normierter Einstellung der Färbebäder sind die mononukleären Zellen deutlich gefärbt und daher gut differenzierbar. Das bei aktivierten Zellen vermehrt auftretende rauhe endoplasmatische Retikulum läßt sich mit dieser Färbetechnik gut nachweisen.

Wichtig ist ein tägliches Wechseln der Färbelösungen zur Konstanthaltung des pH-Wertes und ein Abdecken der Flüssigkeit zwischen den Färbungen um die Verflüchtigung der enthaltenen alkoholischen Bestandteile zu vermeiden.

Die verwendeten McAb stellen eine klinisch etablierte Untersuchungsmethode dar (66,90,93). Zu beachten ist eine exakte Einhaltung der maximalen Haltbarkeit der Antikörper und eine Aufbewahrung bei -10°C (lyophilisierte Antikörper) bzw. $+4^{\circ}\text{C}$ (in Aqua bidest. gelöste Antikörper). Die Inkubation der mononukleären Zellen mit McAb ist ebenfalls bei 4°C durchzuführen, um größere pH-Verschiebungen zu vermeiden. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die Methodik der indirekten Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Untersuchungen haben gezeigt, daß die dabei erhaltenen Ergebnisse sehr gut mit dem Resultaten eines "fluorescence activated cell sorter (FACS)" übereinstimmen, welcher eine quantitativ höhere Anzahl von Zellen auswertet (43).

Bearbeitungszeit: Die Isolierung und Färbung des mononukleären Konzentrates beträgt ca. 70 Minuten. Somit kann das zytologische Ergebnis der Klinik nach 1 Stunde und 30 Minuten mitgeteilt werden. Die Differenzierung dieses Ergebnisses durch Untersuchungen mit McAb erfordert weitere 60 Minuten.

3. Rechtsventrikuläre Endomyokardbiopsie

Seit 12 Jahren repräsentiert die EMB die wesentlichen Parameter zur histologischen Diagnostik von AR nach HTP (10,22,23). Unter CsA Therapie wird in der Literatur die EMB übereinstimmend als einzig verwertbarer Parameter zur Sicherung von AR angegeben (46, 61). Mit dieser Methode ist es möglich, Zellinfiltrate im Herzmuskel zu erkennen und das Gewebe auf ein interstitielles Ödem bzw. auf Zellschäden hin zu beurteilen. Mit Hilfe von Spezialfärbungen, wie der Methyl-Grün-Pyronin-Färbung, werden selektiv aktivierte Lymphozyten angefärbt, wobei ähnlich wie bei der Pappenheim-Färbung das vermehrt vorhandene rauhe, endoplasmatische Retikulum angefärbt wird. Die Methodik selbst erlaubt sehr genau, Inflammationsvorgänge am Herzen selbst festzustellen. Ein Nachteil besteht in der Invasivität dieser Methode, aufgrund der die EMB in der Regel nur in 5 - 10-tägigen Abständen durchgeführt wird (10). Das intravasale Einführen der Biopsiezange gleicht dem Einlegen eines zentralen Venenkatheters in die Vena jugularis interna. Am Herzen selbst ist nach einer Studie von mehr als 5000 EMB eine Perforation der rechten Ventrikelwand berichtet worden, die eine Herzbeuteltamponade zur Folge hatte (9). Allerdings können während der Durchführung der EMB maligne Rhythmusstörungen auftreten. Ein weiterer Nachteil dieser Methode besteht darin, daß bei

zu häufiger Biopsiefrequenz aus einem relativ kleinen Myokardareal nach einer gewissen Zeit nicht bewertbares Narbengewebe aus früheren Biopsiestellen entnommen wird. Dies erschwert eine exakte Diagnose. Eigene Erfahrungen an Patienten bestätigen die relativ große psychische Belastung der EMB für den Patienten. Aus diesem Grunde ist die Indikation zur Myokardbiopsie streng zu stellen und als Verlaufskontrolle täglich nicht durchführbar (10). Um so mehr bedarf es deshalb weiterer, vor allem nichtinvasiver Parameter zur täglichen Diagnostik von Abstoßungsreaktionen.

II. Diskussion der klinischen Ergebnisse

Folgende Grundkrankheiten stellten die Indikation zur Herztransplantation bei den untersuchten 12 Patienten: Koronare Herzkrankheit (n=6), kongestive Kardiomyopathie (n=4), Morbus Uhl, eine degenerative Erkrankung des rechten Ventrikels (n=1), primärer pulmonaler Hypertonus (n=1) als Indikation zur Herzlungentransplantation. Die Literatur beschreibt die koronare Herzkrankheit und die kongestive Kardiomyopathie zusammen mit 91% als Indikation zur HTP, der Rest wird durch Klappenerkrankungen oder angeborene Vitien gestellt (61). Herzlungentransplantationen werden vor allem an Patienten mit primärem pulmonalem Hypertonus vorgenommen.

Bei allen postoperativ überwachten Patienten handelte es sich um Ersttransplantierte. Die 1-Jahresüberlebensrate lag in dem untersuchten Zeitraum bei 72,8%; dies entspricht in diesem Fall auch der 2-Jahresüberlebensrate. Die durchschnittliche 1-Jahresüberlebensrate aller Zentren liegt bei 74% (63). Die besten Ergebnisse werden von der Stanford Universität berichtet:

88% 1-Jahresüberlebensrate (61).

Als Todesursachen waren bei den untersuchten Patienten festzustellen: Pneumonie (n=1), akutes Transplantatversagen (n=1, 10 Stunden p.o.), akute AR (n=1, 73 Tage p.o.), akute gelbe Leberdystrophie (n=2, 10 Tage p.o.) (83,85). In großen Fallstudien (n=288) steht die Infektion als häufigste Todesursache gefolgt von AR, Transplantatarteriosklerose und malignen Tumoren (61).

Die Inzidenz der AR innerhalb der ersten 3 Monate p.o. entsprach bei unseren Patienten 1,8 AR pro Patient, verglichen mit 2,2 AR pro Patient beschrieben in der Literatur (61). Ferner waren bei unseren Patienten 3 generalisierte Virusinfektionen, 2 Bakteriämien und 3 generalisierte Pilzinfektionen zu beobachten. Dies entspricht einer mittleren Infektionsrate von 0,72 Infektionen pro Patient, verglichen mit 0,8 Episoden pro Patient beschrieben in der Literatur unter CsA-Therapie (46). Die bakteriellen Infekte wurden durch Legionella pneumophila (n=1) und Mykobakterium tuberculosis (n=1) verursacht. Die VI waren Herpes simplex

Infektionen, welche auch in großen klinischen Studien den Hauptanteil (mehr als 50%) der VI repräsentieren (6,78). Die Pilzinfektionen waren durch *Candida albicans* bedingt, ebenfalls den beschriebenen Haupterreger von Pilzinfektionen nach HTP (66).

III. Diskussion der experimentellen Ergebnisse

1. Immunologisches Monitoring zur Dosierung von ATG und zur Diagnostik von Abstoßungsreaktionen unter konventioneller Therapie

Seit Mitte der 70iger Jahre bediente man sich unter konventioneller Immunsuppression der sogenannten Rosettentechnik als immunologische Überwachung herztransplantierten Patienten (7,31). Mit dieser Methode kann der prozentuale Anteil an T-Lymphozyten unter den Gesamtlymphozyten bzw. die Absolutzahlen der zirkulierenden T-Lymphozyten bestimmt werden (62,69). Bei den beiden konventionell therapierten Patienten dieser Studie wurde zunächst die ATG-Dosierung individuell nach dem Rosetten-Test eingestellt. Bereits in früheren Arbeiten war die optimale ATG-Dosis dann beschrieben, wenn weniger als 5% T-Lymphozyten unter den mononukleären Zellen, bzw. weniger als 100 T-Lymphozyten/mm³ im peripheren Blut vorhanden waren (9,38,44). Diesem Schema entsprechend wurden die beiden Patienten mit

einer ATG-Dosis zwischen 0,4 und 12 mg/kg KG/Tag behandelt.

Anstiege nach erreichter T-Zellsuppression sind in erster Linie auf beginnende AR zurückzuführen (43,111,112).

Ebenfalls bei den in dieser Studie untersuchten Patienten war vor dem Auftreten aller AR ein Anstieg der Rosetten-Werte um mehr als 100% zu verzeichnen. Somit konnte die in der Literatur beschriebene Wertigkeit des Rosetten-Tests sowohl hinsichtlich der Dosierung von ATG als auch hinsichtlich der Diagnostik von AR in dieser Studie bestätigt werden (9,111).

Im Vergleich zum Rosetten-Test wurde der McAb OKT3 eingesetzt, der ebenfalls periphere T-Lymphozyten markiert (25, 89). Es fanden sich im Verlauf parallele, aber um durchschnittlich 40-60% höhere Werte als bei den Ergebnissen des Rosetten-Tests. Dies bestätigt Untersuchungen, daß unter ATG-Therapie durch den Rosetten-Test falsch niedrige T-Zellwerte ermittelt werden können (43,121).

2. Zyto-immunologisches Monitoring unter Ciclosporin Therapie

a) Veränderungen der Gesamtzahl von Leukozyten, Lymphozyten und -Subpopulationen während Abstoßungsreaktionen

Wie auch bei anderen inflammatorischen Prozessen ist während AR eine relative Leukozytose zu verzeichnen.

Somit ist bei dem postoperativen Auftreten eines Leukozytenanstieges verbunden mit einem Fieberanstieg neben einem bakteriellen Infekt differentialdiagnostisch eine akute Rejektion in jedem Fall auszuschließen.

Der Lymphozytenanstieg beruht ausschließlich auf einem Anstieg der T-Lymphozyten. Die Absolutzahlen der B-Lymphozyten ändern sich nicht vor und während AR. Dies entspricht immunhistologischen Untersuchungen an Biopsien von transplantierten Herzen während AR. Die mononukleären Zellen in diesen Zellen entsprechen peripheren T-Lymphozyten, wie von RABIN beschrieben wurde (82).

b) Auftreten von Lymphoblasten und aktivierten Lymphozyten während Abstoßungsreaktion

Die deutlichste Veränderung im Rahmen der zytologischen Betrachtung des mononukleären Konzentrates war das Auftreten von Lymphoblasten und sogenannten aktivierten Lymphozyten während AR. Als einer der ersten beobachtete ANDRE das Auftreten solcher Lymphoblasten im lymphoiden System während AR nach Allotransplantation (2). Später bestätigte HÄYRY solche Veränderungen in Feinnadelaspiraten transplanterter Nieren (50). Sowohl von diesen als auch von anderen Autoren wird bestätigt, daß diese Blasten und ihre Vorläuferzellen, sogenannte aktivierte Lymphozyten, morphologisch klar von anderen Zellgruppen unterschieden werden können (51,98). Die zytologische

Differenzierung derartiger Zellen wurde in unserem Labor anhand von Feinnadelaspiraten transplanterter Nieren bereits ausgeführt, bevor Herztransplantationen in das klinische Programm aufgenommen wurden (52). Basierend auf diesen Erfahrungen wurden zytologische Untersuchungen zunächst anhand des peripheren Blutes herztransplanterter Hunde durchgeführt, welche keine Immunsuppression erhielten (39). Bei der zytologischen Betrachtung der mononukleären Zellen stellte sich heraus, daß bereits einige Tage vor dem Ableben des Versuchstieres aufgrund einer AR, vermehrt aktivierte Lymphozyten und Lymphoblasten in dem Zellkonzentrat auftraten. Bestätigt wurden diese Beobachtungen während AR unter CsA-Therapie nach allogener und xenogener heterotoper Herztransplantation am Hund (38,87).

Im klinischen Vergleich wurde dieses ZIM bei den ersten 10 herztransplantierten Patienten Deutschlands unter CsA-Therapie eingesetzt. Als entscheidender Parameter für die Diagnose von AR traten Lymphoblasten und aktivierte Lymphozyten jeweils 1-3 Tage vor Rejektionen auf mit durchschnittlich 4,5% Lymphoblasten und 14% aktivierten Lymphozyten pro 100 Lymphozyten im mononukleären Konzentrat. Dies entspricht Absolutzahlen von gemittelt 55 Lymphoblasten und 85 aktivierten Lymphozyten/mm³ peripheren Blutes. Die Erklärung für dieses Phänomen belegten Untersuchungen, die beschreiben, daß nach HTP die am Transplantat aktivierten Lymphozyten in das Blut rezirkulieren (82). Weitere

Studien bestätigten dies dadurch, daß bei der Messung von radioaktiv markierten sensibilisierten Lymphozyten, die Radioaktivität des peripheren Blutes vor und während AR deutlich zunahm (67,68).

Bereits unter konventioneller Immunsuppression hatte die lymphozytäre Blastogenese im peripheren Blut große Bedeutung für die Erkennung von AR. MORRIS von der Stanford Universität berichtete bereits 1978 über die Wertigkeit des modifizierten reaktiven Lymphozyten-Blastogenese-Assays (74). Basierend auf tierexperimentellen Voruntersuchungen (24) wurde dabei mit Hilfe der Messung der zellulären H_3 -Thymidin Inkorporation die DNA-Synthese als Parameter für die lymphozytäre Blastogenese gestimmt. Bevorstehende AR bei herztransplantierten Patienten konnten sehr früh mit dieser Methode anhand des peripheren Blutes erkannt werden (74). In vielen Arbeiten wurde dieser Test als diagnostisches Verfahren für AR unter konventioneller Immunsuppression nach HTP (113,114) und Nierentransplantation (34,56,64,72,103,107) bestätigt. Auch in "nature" wurde die Lymphozytenaktivierung im peripheren Blut als früher Hinweis für Transplantatreaktionen nach Herz- und Nierentransplantation beschrieben (57).

Unter CsA-Therapie gibt es ebenfalls Berichte über die erfolgreiche Anwendung des spontanen Blastogenese-Assays als diagnostische Methode für AR (77). Allerdings existieren auch Arbeiten, welche die Wertigkeit dieses Testes unter

CsA-Therapie nicht bestätigen (35).

Das rein zytologische Erkennen der aktivierten Lymphozyten und Lymphoblasten im mononukleären Konzentrat als diagnostischer Parameter für AR nach HTP ist jedoch in dieser Arbeit erstmals beschrieben.

Bei den hier untersuchten Patienten waren von den insgesamt 111 durchgeführten EMB 31 positiv im Sinne einer AR.

In 29 Fällen war parallel dazu im ZIM eine Aktivierung innerhalb der Lymphozyten zu verzeichnen. Die verbleibenden 2 positiven Biopsien wurden bereits unter Methyl-Prednisolon-Therapie durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt waren durch das hochdosierte Kortison die peripheren Lymphozyten in ihrer Anzahl bereits reduziert, die Inflammation am Herzen allerdings war noch unbeeinflusst.

Die Sensitivität des ZIM bezüglich AR betrug bei den untersuchten Patienten demnach 93,5%. In 38,8% der Transplantatreaktionen war das Zellbild im ZIM bereits mehr als 3 Tage, in 55,5% 2 Tage und in insgesamt 94,5% 1 Tag vor den ersten positiven Zeichen in der EMB auffällig.

Entsprechend anderen Arbeiten über die spontane Blastogenese zeigten diese Ergebnisse erneut, daß entsprechende Veränderungen im peripheren Blut sehr früh eine beginnende AR andeuten (74). Im Vergleich zu den Absolutzahlen zeigen die Prozentzahlen von aktivierten Lymphozyten und Lymphoblasten/100 Lymphozyten eine gleichläufige Tendenz in Bezug auf die Erkennung von Rejektionen. Aus diesem Grunde scheint

es berechtigt, der Klinik in der Regel nur die Prozentzahlen der aktivierten Zellen/100 Lymphozyten mitzuteilen.

Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch BLEESE und HETZER, welche in Anlehnung an diese Arbeit das beschriebene ZIM nach Herztransplantationen als Parameter für AR auswerten (13,59). Die Sensitivität bezüglich Transplantatreaktionen lag in diesen Arbeiten ebenfalls bei über 90%.

c) Verschiebungen innerhalb der Lymphozytensubpopulationen während Abstoßungsreaktionen

Das Verhältnis von T- zu B-Lymphozyten stieg während AR signifikant zugunsten der T-Lymphozyten an. Dies steht in Einklang mit anderen Arbeiten, welche für Transplantatreaktionen am Herzen vor allem T-Lymphozyten verantwortlich machen (82).

Das Verhältnis der Helfer- zu Suppressorzellen (OKT4/OKT8) fiel unter CsA-Therapie deutlich ab. Dies resultiert aus einem Abfall der Prozentzahlen der T-Helferzellen und aus einem relativen Anstieg der Suppressor- oder zytotoxischen Zellen (19,21,109).

Unter konventioneller Immunsuppression kam dem Verhältnis von Helfer- zu Suppressorzellen große Bedeutung hinsichtlich der Früherkennung von AR zu. Ein Anstieg dieses Quotienten wurde als diagnostischer Parameter nach Herz- (20,109) und Nierentransplantationen (11,18,27,30,32,37,

47,76) beschrieben. Bereits unter der konventionellen Immunsuppression gab es gegenteilige Meinungen über die Aussagekraft dieses Verhältnisses bezüglich AR (3,105, 120). Insbesondere unter CsA-Therapie wurde die Wertigkeit der Relation von OKT4/OKT8 sehr in Frage gestellt (21,49,64). Letztere Ergebnisse können in dieser Arbeit bestätigt werden. Vor und während AR ändert sich der Quotient von Helfer- zu Suppressorzellen bei den in dieser Studie untersuchten Patienten nicht signifikant. In Übereinstimmung mit anderen Autoren hat dieses Verhältnis unter CsA-Therapie seine diagnostische Validität bezüglich Rejektionen verloren (21,49,64).

d) Wertigkeit des zyto-immunologischen Monitorings bezüglich der Bestätigung der Abstoßungstherapie

Nach 3-5-tägiger AR-Therapie von je 1 g Methylprednison sanken die Zahlen von Gesamt-, T-, B-, aktivierten Lymphozyten und Lymphoblasten jeweils signifikant. Dies entspricht dem bereits bekannten Phänomen der kortison-induzierten Lymphopenie, resp. Hemmung der Lymphozytenproliferation (42). Bei 7 der untersuchten 9 Patienten war das Absinken von normalen und aktivierten Lymphozyten im peripheren Blut identisch mit dem Abklingen der AR, sichtbar anhand der Myokardbiopsie. Bei 2 Patienten ergab wie erwähnt das periphere Zellbild eine restitutio ad integrum, wobei in der Kontrollbiopsie

noch Zeichen einer weiterbestehenden Transplantatreaktion zu sehen waren. Daraus folgernd ist der Erfolg der Abstoßungstherapie sichtbar im peripheren Blut nicht immer identisch mit den Vorgängen am transplantierten Organ. Eine EMB einige Tage nach Behandlung ist zur Kontrolle des Therapieeffektes deshalb ratsam

e) Fallbeschreibung einer Abstoßungsreaktion

Wie im Ergebnisteil ausführlich dargelegt, waren alle AR des Patienten R.R. begleitet von einer Aktivierung im Zellbild des ZIM. Der Therapieeffekt von Methylprednisolon war sowohl im ZIM als auch in der EMB sichtbar. Nur die letzte und 4. Rejektion, welche erneut durch das ZIM angekündigt wurde, konnte in der Biopsie nicht bestätigt werden. Aufgrund des Überwiegens von Narbengewebe im entnommenen Gewebsmaterial konnte eine AR in dem vorhandenen Gewebe nicht diagnostiziert werden. Eine Methylprednisolon-Therapie wurde aus diesem Grund nicht durchgeführt. Der Patient erlag einer autoptisch gesicherten AR am 73. postoperativen Tag. In Übereinstimmung mit anderen Autoren kann der Myokardbiopsie eine Sensitivität von 100% nicht zugestanden werden (117). Umso dringender erscheint es deshalb, zusätzliche Parameter zur Diagnose einer Transplantatreaktion zu finden.

f) Veränderungen im peripheren Blut während Virusinfektionen

Während Virusinfektionen trat bei den untersuchten Patienten eine relative Leukopenie auf. Der Lymphozytenanstieg und das Auftreten aktivierter Lymphozyten und Lymphoblasten ist ähnlich den Befunden während AR und bereitet deshalb bei rein zytologischer Betrachtung differentialdiagnostisch Schwierigkeiten. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der zytologischen Betrachtung von Feinnadelaspirationen gemacht (101,102). Im Gegensatz zu AR änderte sich jedoch statistisch signifikant das Verhältnis von T-Helfer- zu T-Suppressorzellen. Zum Zeitpunkt der Virusinfektion fiel dieser Quotient von OKT4/OKT8 auf Werte unter 1 ab. Dieses Phänomen ist bereits aus der Literatur bekannt und wurde vielfach differentialdiagnostisch eingesetzt (28,29,48,95). Die Ursachen hierfür liegen in einer Zunahme der Suppressorzellpopulation verbunden mit dem Absinken der T-Helferzellen während CMV, Herpes oder EBV-Infektionen (95). Bei der Fallbeschreibung des Patienten K.H. konnte die erste Aktivierung innerhalb des mononukleären Zellbildes auf eine AR zurückgeführt werden. Der zweite Anstieg war nicht durch eine Transplantatreaktion bedingt. Die parallel auftretende Umkehr des Verhältnisses der Helfer/Suppressorzellen konnte auf eine Herpes simplex Infektion zurückgeführt werden.

Im Zusammenhang mit der Überwachung herztransplantiertter Patienten stellte sich dieser Quotient somit ebenfalls als bedeutsam für die differentialdiagnostische Abgrenzung von AR gegenüber Virusinfektionen heraus.

g) Veränderungen im peripheren Blut bei Pankreatitis und pulmonaler Tuberkulose

Ein Fall von Pankreatitis war begleitet von einer Aktivierung der Zellen im ZIM. Neben der charakteristischen Leukozytose (55) stieg im Gegensatz zu AR und Virusinfektionen der prozentuale Anteil an B-Lymphozyten deutlich an. Ein entsprechender Anstieg fand sich bei dem Fall von pulmonaler Tuberkulose mit der gleichzeitig typischen Leukopenie und Lymphozytose (55). Bei der Untersuchung von weiteren Patienten nach HTP stellte sich heraus, daß ein prozentualer Anstieg der B-Lymphozyten einen wichtigen Hinweis für bakterielle Infektionen und Pilzinfektionen darstellt. Dieser Parameter, zusammen mit einem relativen Anstieg der juvenilen Granulozyten im mononukleären Konzentrat stellte sich als bedeutsam für die Differentialdiagnose zwischen bakteriellen und Pilzinfektionen einerseits und Virusinfektionen und AR andererseits (70).

3. Vergleich der Wertigkeit des zyto-immunologischen Monitorings und der Endomyokardbiopsie

Eine repräsentative EMB besteht aus Herzmuskelzellen, Bindegewebe und Infiltrationszellen. Sie erfaßt allerdings nur Teilbereich aus dem Gebiet der rechten Ventrikelwand und des Ventrikelseptums und gibt weniger Aufschluß über die Gesamtinflammation am Herzen. Außerdem handelt es sich dabei um eine invasive Untersuchungsmethode.

Das ZIM gibt Angaben über Zahl und Aktivierungszustand der Lymphozyten im peripheren Blut. Es erlaubt zwar keinen spezifischen Aufschluß über Reaktionen im transplantierten Herzen, aber ist sehr empfindlich gegenüber beginnenden Proliferationsvorgängen von Lymphozyten im Organismus des transplantierten Patienten. Ein weiterer großer Vorteil dabei ist, daß das ZIM als nichtinvasives Verfahren täglich durchgeführt werden kann und zusätzlich sehr früh auf beginnende Rejektionen hinweisen kann. 93,5% aller durch die EMB verifizierten AR wurden von einer Aktivierung der Lymphozyten im mononukleären Konzentrat z.T. sehr früh angekündigt. In 6,5% war das Ergebnis des ZIM falsch negativ. Dabei handelte es sich nicht um akut neu auftretende AR, sondern um histologisch diagnostizierte und weiterbestehende Transplantatreaktionen unter massiver Abstoßungstherapie. Aus diesen Angaben läßt sich schließen, daß das ZIM eine hohe Sensitivität gegen-

über AR besitzt. Der Erfolg der Rejektionstherapie läßt sich allerdings durch den beschriebenen Test nicht immer verifizieren.

Die Spezifität des ZIM bezüglich AR betrug 70%. 30% der positiven Ergebnisse waren demnach nicht durch Transplantatreaktionen bedingt. 41% dieser falsch positiven Ergebnisse waren durch Virusinfektionen verursacht und konnten durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen Helfer- und Suppressorzellen differentialdiagnostisch von AR abgegrenzt werden. Wie erwähnt, erreichte dieser Quotient während VI Werte deutlich kleiner als 1.

Ein Teil der verbleibenden falsch positiven Resultate grenzte sich durch den deutlichen prozentualen Anstieg der B-Lymphozyten gegenüber AR ab. Ursache dafür waren in dieser Studie vor allem bakterielle Infektionen und ein Fall von Pankreatitis. Diese Hinweise wurden bei der Untersuchung weiterer Patienten nach HTP bestätigt (70).

In einem Fall war eine klinisch deutlich erkennbare AR von einer negativen EMB begleitet. Es wurde auch von anderen Autoren beschrieben, daß die EMB unter CsA-Medikation ebenfalls keinen Parameter mit einer Sensitivität von 100% mehr darstellt (116). Daraus erklärt sich der Bedarf an zusätzlichen Untersuchungen, welche täglich durchgeführt werden können und auf eine bevorstehende AR nach HTP hinweisen. Diese Ansprüche werden von dem ZIM in einem hohen Prozentsatz erfüllt.

4. Klinische Anwendung des zyto-immunologischen Monitorings

Das unter konventioneller Therapie durchgeführte immunologische Monitoring mittels des Rosetten-Tests hat unter CsA-Therapie seine diagnostische Bedeutung hinsichtlich AR verloren (46). Somit verblieb die EMB als Standardverfahren zur Diagnose von AR. Die EMB wurde dabei routinemäßig alle 5 - 10 Tage durchgeführt. Dies ergab bei den ersten 9 Patienten eine mittlere Biopsienzahl von 14,7 EMB in den ersten 3 Monaten p.o.. Ab dem 10. Patienten wurde in der Klinik begonnen, EMB nur dann durchzuführen, wenn im ZIM eine Aktivierung innerhalb der Lymphozyten beobachtet wurde. Die Indikationsstellung zur EMB entsprechend den Ergebnissen im ZIM resultierte bei Patient Nr.10 in einer Anzahl von 8 EMB in den ersten 3 Monaten p.o.. Wegen der hohen Sensitivität des ZIM wurden bei später transplantierten Patienten nicht mehr als 3 - 4 EMB pro Patient im selben Zeitraum durchgeführt. Dies entspricht einer Reduktion der Biopsien um ca. 75 % durch eine erfolgreiche Anwendung des ZIM (88). Dadurch konnten also nicht nur Biopsien eingespart werden, sondern diese vor allem gezielt dann eingesetzt werden, wenn sich die Transplantatreaktion noch in einem sehr frühen Anfangsstadium befand.

ZIM und EMB sollten also nicht als konkurrierende, sondern als sich ergänzende Maßnahmen verstanden werden.

5. Alternative, nichtinvasive Methoden zur Diagnostik von Abstoßungsreaktionen

Als weitere nichtinvasive Möglichkeiten zur Diagnostik von Transplantatreaktionen unter CsA-Therapie sind klinisch angewendet worden:

1. Das Echokardiogramm, welches Veränderungen in der diastolischen Funktion als Parameter für AR verwendet. Die Sensitivität dieser Methode wird mit 87% beschrieben (33).
2. Ein epikardial abgeleitetes EKG, welches durch direkte Ableitung am Herzen über einen implantierten Herzschrittmacher Veränderungen der Summenvoltage erfaßt. Bei diesem EKG wurde eine Sensitivität von 85% errechnet (117). Allerdings ist diese Methode mit der Implantation eines Herzschrittmacherapparates verbunden und stellt somit einen Risikofaktor für Infektionen dar.
3. Die Messung von Neopterin im Urin hat ebenfalls eine relativ hohe Sensitivität gegenüber AR von 95%. Allerdings zeigt diese Methode zu einem großen Teil falsch positive Ergebnisse, denn ein erhöhter Spiegel dieser Neopterine kann ebenfalls durch verschiedenste Arten von Infektionen bedingt sein, welche von AR nicht unterschieden werden können (73).

Das ZIM stellt mit einer Sensitivität von 93,5% und einer Spezifität von 70% einen vergleichsweise guten Test zur Diagnostik von Transplantatreaktionen dar. Vor allem aufgrund seiner Nichtinvasivität kann dieser Test täglich durchgeführt werden. Das ZIM stellt eine sinnvolle Ergänzung zur EMB dar. Denn zum einen werden unnötige Biopsien eingespart und zum anderen werden die EMB zu einem Zeitpunkt eingesetzt, wenn sich die Rejektion noch in einem sehr frühen Stadium befindet.

E ZUSAMMENFASSUNG

Das zytologische und immunologische Monitoring ermöglicht die Beurteilung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes und die Unterteilung der Lymphozytensubpopulationen mittels monoklonaler Antikörper.

1. Das ZIM ist eine einfache, nichtinvasive und schnelle Untersuchungsmethode, die täglich durchgeführt werden kann.
2. Die Sensitivität des ZIM gegenüber AR beträgt 93,5%; d.h. 93,5% aller Transplantatreaktionen waren begleitet von einer Aktivierung innerhalb der Zellen des mononukleären Konzentrates. Das Zellbild wurde dann als aktiviert bezeichnet, wenn mehr als 1 Lymphoblast oder mehr als 50 aktivierte Lymphozyten/mm³ im peripheren Blut auftraten.
3. Das ZIM ermöglicht eine frühzeitige Diagnose des Abstoßungsbeginns. Hinweise auf eine AR sind im ZIM erkennbar, bevor klinische Zeichen einer AR auftraten. Ferner war in über 94% die Aktivierung im mononukleären Zellbild mindestens 24 Stunden vor dem ersten positiven Biopsieergebnis sichtbar.
4. Das ZIM erlaubt eine Beurteilung des Abstoßungsverlaufes unter der Abstoßungstherapie. Die Verabreichung von Methylprednisolon führte in 80% der Fälle zu einem Absinken der Gesamtzahlen von Lymphoblasten und aktivierten Lymphozyten im peripheren Blut.

5. Die Spezifität des ZIM gegenüber AR beträgt 70%.
Ein großer Teil (40%) der falsch positiven Ergebnisse im ZIM war durch Virusinfektionen verursacht.
6. Virusinfektionen konnten durch den Einsatz von McAb differentialdiagnostisch von AR abgegrenzt werden.
Während dieser viralen Infektionen war der Quotient von Helfer- zu Suppressorzellen deutlich kleiner als 1. Dies steht im Gegensatz zur normalen Relation dieser Zellen zueinander, die auch während AR größer als 1 ist.
7. Das ZIM ersetzt noch nicht die EMB, da die Biopsie als einzige Methode eine Diagnostik in situ erlaubt. Das ZIM dient vor allem zu einem gezielten Einsatz der EMB.
8. Die Indikationsstellung zur Myokardbiopsie entsprechend den Ergebnissen im ZIM reduziert nicht nur deutlich die Zahl dieser invasiven diagnostischen Maßnahme, sondern erlaubt, eine AR in einem möglichst frühen Anfangsstadium zu diagnostizieren. In diesem Stadium sind bereits Zellinfiltrationen am Herzen zu erkennen, aber eine Zerstörung des Myokards liegt noch nicht vor. Dies stellt eine optimale Ausgangssituation für eine Abstoßungstherapie dar.

Im Rahmen der postoperativen Untersuchungen nach Herztransplantation stellt das zytologische und immunologische Monitoring neben der Klinik des Patienten und neben Endomyokardbiopsien einen wichtigen zusätzlichen Parameter zur täglichen postoperativen Verlaufskontrolle dar.

F LITERATURVERZEICHNIS

1. ALBERT E., SCHOLZ S.:

Das Histokompatibilitätssystem des Menschen: Serologie,
Genetik und klinische Bedeutung.

Immunforschung: Klinik und Labor, Fresenius Stiftung:
77 - 105 (1979)

2. ANDRE J.A., SCHWARTZ R.S., MITUS W.J., DAMESHEK W.:

The morphological responses of the lymphoid system to
homografts: I., First and second set responses in normal
rabbits.

Blood 19: 313 - 317 (1962)

3. ARANJO J.F., WILLIAMS J.M., HEIDECHE C.D., CHRISTENSEN L.,
TILNEY N.L.:

Cell-cycle analysis and lymphocyte subsets in rejecting
rat cardiac allografts.

X International Congress of the Transplantation Society,
Minnesota, USA, Abstract S. 57

4. BARNARD C.N.:

The Operation.

S.Afr.Med.J. 41: 1271 (1967)

5. BAUMGARTNER W.A., BORKON S.M., ACHUFF S.C., BAUGHMAN K.L.,
TRAILL T.A., REITZ B.A.:

Heart- and heart-lung transplantation: Development,
Organization, and Initiation.

Heart Transpl. 4:197 - 201 (1985)

6. BAUMGARTNER W.A.:

Infection in Cardiac Transplantation.

Heart Transpl. 3:75 - 80 (1983)

7. BEGEMANN H.:
Praktische Hämatologie.
Thieme Verlag (1982)
8. BIEBER C.P., GRIEPP R.P., OYER P.E., DAVID L.A., STINSON E.B.:
Relationship of rabbit ATG serum clearance rate to circulating T-cell level, rejection onset and survival in cardiac transplantation.
Transpl.Proc. 9: 1031 - 1037 (1977)
9. BIEBER C.P.:
Pharmakokinetics of antithymocyte globuline and cardiac transplant outcome.
Heart Transpl. 1: 22 - 24 (1981)
10. BILLINGHAM M.E.:
Diagnosis of cardiac rejection by endomyocardial biopsies.
Heart Transpl.1: 25 - 29 (1981)
11. BINKLEY W.F., VALENZUELA R., BRAUN W.E., DEODAR S.D., NOVICK A.C., STEINMÜLLER D.R.:
Flow Cytometry quantification of peripheral blood T-cell subsets in human renal allograft recipients.
Transpl.Proc. 15: 1163 - 1165 (1983)
12. BISHOP G., COSIMI A.B., VOYNON N.K., WHELCHER J.D.:
Effect of Immunosuppressive Therapy for Renal Allografts on the Number of Circulatory Sheep Red Cell Rosetting Cells.
Transpl.20: 123 - 129 (1975)
13. BLEESE N., ARNDT R., DELLING G., KASISCHKE D., RODEWALD G., RÖDIGER W., SCHÄFER H., BLEESE E.:
Neue Aspekte der Rejektionsdiagnostik und -therapie nach orthotoper Herztransplantation.
Thorac.Cardiovasc.Surg. 33: 91 - 92 (1985)

14. BOREL J.F.:

Essentials of Cyclosporine A, a novel type of anti-lymphocyte agent.

Pharmacolog.Sciences 16: 146 - 150 (1980)

15. BOYUM A.:

Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood.

Scand.J.Clin.Lab.Invest. 21, Suppl. 97: 77 - 79 (1960)

16. BREARD J., REINHERZ E.L., KUNG P.C., GOLDSTEIN G., SCHLOSSMAN S.F.:

A monoclonal antibody reactive with human peripheral blood monocytes.

J.Immunol.124: 1945 - 1948 (1980)

17. BRETSCHNEIDER M.J.:

Optimalization of myocardial protection.

International Symposium on Myocardial Protection, Göttingen, FRG, May 13-15 (1979)

18. BURTON R.C., COSIMI A.B., COLVIN R.R., RUBIN R.H., DELMONICO R. GOLDSTEIN G., RUSSEL A.B.:

Monoclonal antibodies to human T-cell subsets: Use for immunological monitoring and immunosuppression in renal transplantation.

J.Clin-Immunol. 2: 142 - 147 (1982)

19. von BUSEN C.T., KERMAN R., AGOSTINO G., PAYNE W., FLECHNER G., KAHAN B.D.:

The cellular target of Cyclosporine A action in humans.

Surgery 92: 167 - 174 (1982)

20. CABROL C., GANDJBAKHCH J., PAVIE A., CABROL A., MATTEI M.F., VIARS P., GLUCKMAN J.C., ROTTENBOURGH J.:

Current management of heart transplant patients at the La Pitie Hospital in Paris.

Heart Transpl. 1: 275 - 279 (1981)

21. CARTER N.P., CULLEN R.P., THOMPSON J.F., BEWICK A.L.T.,
WOOD R.F.M., MORRIS P.J.:
Monitoring of lymphocyte subpopulations in renal allo-
graft recipients.
Transpl.Proc.15: 1157 - 1159 (1983)
22. CAVES P., STINSON E., BILLINGHAM M., GRAHAM A., SHUMWAY N.E.:
Percutaneous transvenous endomyocardial biopsy in human
heart recipients.
Ann.Thorac.Surg.16: 325 - 336 (1973)
23. CAVES P., STINSON E., GRAHAM A., BILLINGHAM M., GREHL T.,
SHUMWAY N.E.:
Percutaneous Transvenous Endomyocardial Biopsy.
JAMA 225: 288 - 291 (1973)
24. CAVES P., DONG E., MORRIS R.E., SHUMWAY N.E.:
The immunologic diagnosis of orthotopic cardiac allograft
rejection in dogs.
Transpl.Proc. 5: 745 - 749 (1973)
25. CHANG T.W., KUNG P., GINGRES S.P., GOLDSTEIN G.:
Does OKT3 monoclonal antibody react with an antigen re-
cognition structure on human T-Cell?
Proc.Natl.Acad.Sci. 75: 1805 - 1808 (1981)
26. CHATENAUD L., BACH J.F.:
The use of monoclonal antibodies for the follow up of
transplanted patients.
Heart Transpl.2: 47 - 51 (1982)
27. CHATENAUD L., CHKOFF N., KREIS H., BACH J.F.:
Interest in and limitations of monoclonal anti-T-cell
antibodies for the follow up of renal transplant patients.
Transpl. 36: 45 - 50 (1983)

28. CHATENAUD L., CHKOFF N., KREIS H., BACH F.:
Correlation between immunoregulatory T-cell imbalances
and renal allograft outcome.
Transpl.Proc. 15: 1184 - 1185 (1983)
29. CHATENAUD L., BERRI H. S., BENE M.C., KREIS H., BACH J.F.:
The effects of immunomodulation on peripheral T-cell
subsets.
J.Clin.Immunol. 2, Suppl.: 61-66 (1982)
30. COLVIN R.B., COSIMI A.B., BURTON R.C., WELMONICO F.L.
JEFFERS G., RUBIN R.H., TOLKOFF N.E., GIORGI J.F.,
RUSSEL P.S.:
Circulating T-cell subsets in 72 human renal allograft
recipients; the OKT4/OKT8 ratio correlated with reversi-
bility of graft injury and glomerulopathy.
Transpl.Proc. 15: 1166 - 1169 (1983)
31. COSIMI A.B., WORTIS H.H., DELMONICO F.L., RUSSELL P.S.:
Randomized clinical trial of antithymocyte globuline in
cadaver renal allograft recipients. Importance of T-cell
monitoring.
Surgery 80: 155 - 163 (1976)
32. COSIMI A.B., COLVIN R.B., BURTON R.C., RUBIN R.H., GOLDSTEIN G.
KUNG P.C., HANSEN W.P., DELMONICO F.L., RUSSELL P.S.:
Use of monoclonal antibodies to T-cell subsets for immuno-
logic Monitoring and treatment in recipients of renal allo-
grafts.
The New Engl.J.Med. 305: 308 - 314 (1981)
33. DAWKINS K.D., OLDERSHAW P.J., BILLINGHAM M.E., HUNT S.A.,
OYER P.E., JAMIESON S.W., POPP R.L., STINSON E.B., SHUMWAY N.E.
Changes in diastolic function as a marker of cardiac allo-
graft rejection.
Heart Transpl. 3: 286 - 294 (1984)

- . DESPONT J.P., STEINER F., BANDERET E.:
Functional and biochemical characteristics of human "null"
lymphoid cells.
Transpl. 31: 251 - 256 (1981)
- . DEVINENI R., MCKENZI N., KOSTAK W.J., HEIMBECKER R.O.,
KEOWN P., STILLER C., SILVER M.D.:
Cyclosporine in cardiac transplantation: Observation on
immunologic monitoring, cardiac histology and function.
Heart Transpl. 2: 219 - 223 (1983)
- . DIMITRIU A., DEBRAY-SACHS M., DESCAMPS B., SULTAN C.,
HAMBURGER J.:
Tritiated Thymidine incorporation in blood leukocytes of
renal allograft recipients.
Transpl.Proc.3: 1577 - 1582 (1971)
- . ELLIS T.M., MOHANAKUMAR T., MUAKKARSA W., LOWER R.R., LEE H.M.:
Influence of immunosuppressive therapy and blood trans-
fusion on human T-cell subpopulations.
Transpl.Proc.15: 1173 - 1175 (1983)
- . ENGLISH T.A., COOPER D.K.C., CORY PEARSE R.:
Recent experience with heart transplantation.
Brit.Med.J.281: 699 - 702 (1980)
- . ERTEL W.:
Zyto-immunologisches Monitoring nach allogener und xenogener
Herztransplantation im Tiermodell.
Dissertation (1986)
- . ERTEL W., REICHENSPURNER H., HAMMER C., WELZ A., ÜBERFUHR P.,
HEMMER W., REICHART B., GOKEL J.M.:
Immunologic monitoring in dogs after allogenic heterotopic
heart transplantation.
Heart Transpl.3: 268 - 273 (1984)

41. EWALD R.W.:

Die direkte serologische crossmatch-Reaktion for Nieren-transplantation.

Hrsg.: von ALBERT F.W., Schattauer Verlag, Stuttgart,
S. 41 - 52 (1980)

42. FORTH W., HENSCHLER D., RUMMEL D.:

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.

B - 3 Wissenschaftsverlag, S. 378 - 389 (1984)

43. GANGHOFF O., GROSS U., WHITLEY T.K., ROEBUCK D., THOMAS J.M.:

Factors in the accuracy and reproducibility of T-cell-
and T-cell subset measurement in transplant patients.

X International Congress of the Transplantation Society.
Minneapolis, Abstract B 17 (1984)

44. GOLDMAN M.H., MOHANAKUMAR T., HESS M.L., MENDEZ PICON G.J.,
LEE H.M., WOLFGANG T.C., SZENPETERY S.S., HASTILLO A., LOWER R.R.

Antithymocyte globuline and immunologic monitoring in cardiac transplantation.

Heart Transpl.1: 18 - 21 (1981)

45. GRIFFITH R.P., HARDESTY R.L., DEEB M.G., STARZL T.E.,
BAHNSON H.T.:

Cardiac transplantation with Cyclosporine A and Prednisone.
Ann.Surg.196: 324 - 329 (1982)

46. GRIFFITH R.P., HARDESTY R.L., THOMPSON M.E., DUMER J.S.,
BAHNSON H.T.:

Cardiac transplantation with Cyclosporine, the Pittsburgh Experience.

Heart Transpl.2: 251 - 256 (1983)

47. GUTTMANN R.D., POULSEN R.:

Fluorescence activated cell sorter analysis of lymphocytes following renal transplantation.

Transpl.Proc.13: 1579 - 1583 (1981)

48. GUTTMANN R.D., POULSEN R.S.:

Fluorescence activated cell sorter analysis of lymphocyte subsets after renal transplantation.

Transpl.Proc.15: 1160 - 1162 (1983)

49. HAAS G.S., HALPERIN E., DOSERTZ D., BARRETT L., JEFFAS G.,
DELMONICO F.L., DAGGETT W.M., RUSSELL P.S., COSIMI A.B.:

The effect of Cyclosporine and lymphoid irradiation on allograft survival and peripheral blood T-cells.

Heart Transpl.3: 152 - 159 (1984)

50. HÄYKÄ P., LINDSTROM B.L., VIROLAINEN M., PASTERNAK A.,
LINDFORS D.:

Immunological diagnosis of rejection in dogs with renal allografts.

Surgery 71: 494 - 506 (1972)

51. HALL J.G.:

Studies of the cells in the afferent and efferent lymph of lymph nodes draining the site of skin allografts.

J.Exp.Med.125: 737 - 740 (1967)

52. HAMMER C., MAYER P., KREUZER E., LAND W.:

Feinnadelaspirationszytologie zur Diagnose von Nierentransplantatabstoßung.

Langenbecks Archiv Chir.355: 642 - 644 (1981)

53. HARRISON .:

Principles of Internal Medicine.

McGraw Hill Book Company 10th edition (1983)

54. HECKNER F.:

Praktikum der mikroskopischen Hämatologie.

Verlag Urban & Schwarzenberg (1981)

55. HEILMEYER L., BEGEMANN H.:
Atlas der Klinischen Hämatologie.
Springer Verlag (1977)
56. HERSH E.M., BUTLER W.T., ROSSEN R.D., MORGAN R.O., SUKI W.:
In vitro studies of the human response to organ allografts:
Appearance and detection of circulating activated lympho-
cytes.
J.Immunol.107: 571 - 578 (1971)
57. HERSH E.M., BUTLER W.T., ROSSEN R.D., MORGAN R.O.:
Lymphocyte activation: A rapid test to predict allograft
rejection.
Nature 226: 757 - 758 (1970)
58. HESS M.L., HASTILLO A., WOLFGANG T.C., LOWER R.R.:
The non invasive diagnosis of acute and chronic cardiac
allograft rejection.
Heart Transpl. 1: 31 - 38 (1981)
59. HETZER R., WARNECKE H., SCHÜLER S., SÜTHOFF U., FRIMPONG F.,
LANG W., WONIGEIT K., SCHAPS D., HERRMANN G., BORST H.G.:
Herztransplantationen - Ein klinischer Erfahrungsbericht.
MMW 127: 359 - 365 (1985)
60. JAMIESON S.W., OYER P.E., REITZ B.A., BAUMGARTNER W.A.,
BIEBER C.P., STINSON E.B., SHUMWAY N.E.:
Cardiac transplantation at Stanford.
Heart Transpl.1: 86 - 91 (1982)
61. JAMIESON S.W., OYER P.E., BALDWIN J., BILLINGHAM M.E.,
STINSON E.B., SHUMWAY N.E.:
Heart transplantation for end stage ischemic heart disease:
The Stanford experience.
Heart Transpl.3: 224 - 227 (1984)

2. JONAL M., HOLM G., WIGZELL H.:
Surface markers on human T and B lymphocytes.
J.Exp.Med.136: 207 - 209 (1972)
3. KAYE M.P., ELCOMBE S.A., O'FALLON W.M.:
The international heart transplantation registry.
Heart Transpl.4: 290 - 294 (1985)
4. KERMAN R.H., von BUSEN C.T., PAYNE W., FLECHNER S., KOHAN B.D.:
Monitoring of T-cell subsets and immune events in renal
allograft recipients.
Transpl.Proc.15: 1170 - 1172 (1983)
5. KÖHLER G., MILSTEIN L.:
Continuous culture of fused cells secreting antibody of
predefined specificity.
Nature 256: 495 (1975)
6. KUNG P., GOLDSTEIN G., REINHERZ E.L., SCHLOSSMAN S.F.:
Monoclonal antibodies defining distinctive human T-cell
surface antigens.
Science 206: 347 - 349 (1979)
7. KUPIEC WEGLINSKI J.W., TILNEY N.L.:
Migration patterns of lymphocytes from recipients of
organ allografts.
Transplantation 32: 121 - 127 (1981)
8. KUPIEC WEGLINSKI J.W., OLZEWSKI W.L., TILNEY N.L.:
Changes in lymphocyte migration patterns after heart
grafting in rats.
Transpl. Proc. 13: 1108 - 1110 (1981)
9. LAY W.H., MANDEZ N.F., BIANCO F.:
Binding of sheep red blood cells to a large population
of human T-lymphocytes.
Nature 230: 531 - 532 (1971)

70. LERSCH C., PFAHL M., LEHMANN M., REICHENSPURNER H., HAMMER C., REICHART B.:
Differentialdiagnose zwischen Abstoßungsreaktionen, viralen, bakteriellen und Pilzinfektionen im peripheren Blut herztransplanterter Patienten.
Chir.Langenbecks Arch. 367: 179 - 181 (1985)
71. LOWER R.R., STOFFER R.C., SHUMWAY N.E.:
Studies on orthotopic transplantation of the canine heart.
Surg.Forum 11: 18 - 21 (1960)
72. McDONALD J.C., LEE J.H.:
"Spontaneous" blastogenic transformation - a monitor of immunosuppression.
Arch.Surg.109: 320 - 325 (1974)
73. MARGREITER R., FUCHS D., HANSEN A., HUBER C., REIBNEGGER G., SPIELBERGER M., WACHTER H.:
Neopterin as a new biochemical marker for diagnosis of allograft rejection.
Transpl. 36: 650 - 653 (1983)
74. MORRIS P.E., DONG E., STRUTHERS C.M., GRIEPP R.B., STINSON E.B.:
Immunologic monitoring of cardiac transplant recipients by a modified reactive leucocyte blastogenesis assay.
Transpl.Proc. 10: 585 - 588 (1978)
75. MOSIMOTO C., DISTASO J., BOREL Y., SCHLOSSMAN S.T., REINHERZ E.L.:
Communicative interaction between subpopulations of human T-lymphocytes required for generation of suppressor-effector function and primary antibody response.
J.Immunol. 128: 2402 - 2406 (1984)
76. NANNI COSTA A., VANFELISTA A., FRASCA G.M., STEFONI S., BONOMINI V.:
T-cell subsets in renal allograft recipients.
Transpl.Proc. 15: 1176 - 1177 (1983)

77. OKA T., YOSHIMURA Y., AIKAWA J., MATSUMARA T., USUI T.,
ARAKAWA H.:
Analysis of lymphocytes concerned in spontaneous blastogenesis during acute rejection.
Transpl.Proc.15: 2298 - 2301 (1983)
78. OYER P.E., STINSON E.B., REITZ B.A., BILLINGHAM M.E.,
BAUMGARTNER W.A., JAMIESON S.W., SHUMWAY N.E.:
One year experience with Cyclosporine A in clinical heart transplantation.
Heart Transpl.1: 285 - 288 (1982)
79. OYER P.E.:
Heart transplantation at the University of Stanford.
J.Surg.Res.16: 392 - 393 (1984).
80. OYER P.E., STINSON E.B., BIEBER C.P., REITZ B.A., RANAY A.A.,
BAUMGARTNER W.A., SHUMWAY N.E.:
Diagnosis and treatment of cardiac allograft rejection.
Transpl.Proc.11: 296 - 303 (1979)
81. OYER P.E., STINSON E.B., JAMIESON S.W., HUNT S.A.,
BILLINGHAM M.E., SCOTT W., BIEBER C.P., REITZ B.A., SHUMWAY N.E.:
Cyclosporine A in cardiac allografting: a preliminary experience.
Transpl.Proc.15: 1247 - 1252 (1983)
82. RABIN B.:
Immunologic aspects of human cardiac transplantation.
Heart Transpl.2: 188 - 190 (1983)
83. REICHART B., REBLE B., FUNCCIUS W., KEMKES B.M., ÜBERFUHR P.,
WELZ A., PETERS D., HAMMER C., REICHENSPURNER H., ERTEL W.,
LAND W., GOKEL M.:
Heart transplantation at the University of Munich.
Heart Transpl.4: 25 (1984)

84. REICHART B., UBERFUHR P., WELZ A., KEMKES B.M., KLINNER W.,
REBLE B., FUNCCIUS W., HAMMER C., ERTEL W., REICHENSPURNER H.,
PETERS D., GOKEL M., LAND W., FRANKE N.:

Heart transplantation at the University of Munich - the
first and a half years.

Heart Transpl.2: 266 - 269 (1983)

85. REICHENSPURNER H., ERTEL W., LERSCH C., HAMMER C., BRENDEN W.,
REICHART B., REBLE B., UBERFUHR P., WELZ A., KEMKES B.M.,
GOKEL M.:

Cytological and immunological monitoring - a noninvasive
method for diagnosis of rejection episodes.

Heart Transpl.3, Suppl.: 180 (1984)

86. REICHENSPURNER H., ERTEL W., HAMMER C., PETERS D., WELZ A.,
UBERFUHR P., REICHART B., KEMKES B.M., GOKEL J.M.:

Xenogeneic and allogeneic heterotopic heart transplan-
tation in dogs - a model for diagnosis of rejection
mechanisms.

Heart Transpl., in press, 1986

87. REICHENSPURNER H., KEMKES B.M., OSTERHOLZER G., REBLE B.,
REICHART B., LERSCH C., HAMMER C., HABERL R., STEINBECK G.,
GOKEL J.M.:

Particular control of infection and rejection episodes
after 4 years cardiac transplantation.

Texas Heart Inst.J., in press (1986)

88. REINHERZ E.L., KUNG P., GOLDSTEIN G., SCHLOSSMAN S.F.:

A monoclonal antibody with selective reactivity with
functionally mature human thymocytes and all peripheral
human T-cells.

J.Immunol.123: 1312 - 1317 (1979)

89. REINHERZ E.L., KUNG P.C., GOLDSTEIN G., SCHLOSSMAN S.F.:
Separation of functional subsets of human T-cells by a monoclonal antibody.
Proc.Natl.Acad.Sci.76: 4061 - 4065 (1979)
90. REINHERZ E.L., KUNG P.C., GOLDSTEIN G., SCHLOSSMAN S.F.:
Further characterization of the human inducer T-cell subset defined by monoclonal antibody.
J.Immunol.123: 2894 - 2897 (1979)
91. REINHERZ E.L., MOSIMOTO C., PENTA A.C., SCHLOSSMAN S.F.:
Regulation of B-cell immunoglobuline secretion by functional subsets of T-lymphocytes.
Eur.J.Immunol.10: 570 - 573 (1980)
92. REINHERZ E.L., LUNG P.C., GOLDSTEIN G., SCHLOSSMAN S.F.:
A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic suppressor T-cell subset previously defined by a hetero-antiserum TH₂.
J.Immunol.124: 1303 - 1307 (1980)
93. REINHERZ E.L., KUNG P.C., GOLDSTEIN G., LEVEY R.H., SCHLOSSMAN S.F.:
Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leucemic lymphoblasts of T-cell lineage.
Proc.Natl.Acad.Sci.77: 1588 - 1592 (1980)
94. REINHERZ E.L., O'BRIAN C., ROSENTHAL B., SCHLOSSMAN S.F.:
The cellular basis for viral induced immunodeficiency. Analysis by monoclonal antibodies.
J.Immunol.123: 1269 - 1272 (1980)
95. REITZ B.A., WALLWORK J.L., SHUNT S.A., OYER P.E., STINSON E.B., SHUMWAY N.E.:
Heart-lung transplantation: Successfull therapy for patients with pulmonary vascular disease.
N.Engl.J.Med.306: 557 - 564 (1982)

96. ROITT J.:
Essential Immunology.
Blackwell scientific publication (1974)
97. SCOTHORNE R.J., MCGREGOR J.A.:
Cellular changes in lymphnodes and spleen following skin
homografting in rabbit.
J.Anat.89: 283 - 288 (1955)
98. SHAPIRO H.A.:
Experience with human heart transplantation.
Proc.of the Cape Town Symposium, July 13 - 16 (1968)
Butterworth Durban (1969)
100. SMITH W.J., BURDICK J.F., WILLIAMS G.M.:
Immunologic monitoring of renal transplant patients.
Transpl.Proc.15: 1182 - 1185 (1983)
101. STADLER J., KOLLER C., HAMMER C., WEBER B., LAND W., CASTROL A.
BRENDL W.:
Monitoring of viral infections by fine needle aspiration
biopsy and monoclonal antibodies.
Europ.J.Surg.Res.16: Suppl.1: 113 - 114 (1984)
102. STADLER J.:
Immunologisches Monitoring nach Nierentransplantation.
Differenzierung von mononukleären Zellen mit monoklo-
nalen Antikörpern im peripheren Blut und Feinnadelaspirat.
Dissertation (1986)
103. STILLER C.R., KEOWN P.A.:
Immunologic monitoring: Perspectives and clinical impli-
cations.
Transpl.Proc.13: 1699 - 1711 (1981)

104. STRUCK E., HAGL S., KÖNIG E., SEBENING F., LAND W.,
RICHTER J., ALBERT E., ANGSTWURM H., BILLING J., DÖRING G.,
FEIFEL G., GOKEL J.M., GÖSSNER W., HAMMER C., KLEIN U.,
MEISNER H., MEYENDORF F., SCHMIDT-HABELMANN P., SEBENING B.:
Herztransplantation - erfolgreiche Behandlung postoperativer
Komplikationen.
Herz 7: 406 - 423 (1982)
105. STRUCK E., HAGL S., GOKEL J.M., LAND W., HAMMER C., MENDLER N.:
Immunological and historical monitoring in clinical heart
transplantation.
Thorac.Cardiovasc.Surg.30: 33 - 34 (1982)
106. STRUCK E., HAGL S., MEISNER H., GOKEL J.M., SEBENING F.:
A case report of cardiac transplantation - survival after
introduction of Cyclosporine A.
Heart Transpl.2: 270 - 272 (1983)
107. SUCIU FOCA N., BUDA J.N., THIEM T., SUCIU T.:
Serial determination of blast cell count during allograft
rejection in rats.
Transpl.14: 711 - 715 (1972)
108. SEVERYN W., FLAA C., FULLER L., KYRIAKIDIS G.K., ESQUENAZI V.,
MÜLLER J.:
The role of immunological monitoring in transplantation.
Heart Transpl.1: 222 - 229 (1982)
109. SWENY P., TIDMAN N.:
The effect of Cyclosporine A on peripheral blood T-cell
subpopulations in renal allografts.
Clin.Exp.Immunol.47: 445 - 448 (1982)
110. THOMAS G., SOSMAN J., IRIGONGEN O., FRIEDMAN S.M., KUNG P.C.,
GOLDSTEIN G., CHERS L.:
Functional analysis of human T-cell subsets defined by
monoclonal antibodies.
J.Immunol.125: 2402 - 2407 (1981)

111. THOMAS F., MENDEZ PICON G., THOMAS J., LEE H.M., LOWER R.:
Effective monitoring and modulation of recipient immune reactivity to prevent rejection in early posttransplant period.
Transpl.Proc.10: 537 - 541 (1978)
112. THOMAS F., THOMAS J.,MENDEZ G., LEE H.M., LOWER R.:
Individualization of recipient immunosuppression by use of in vitro monitoring parameters.
Transpl.Proc.10: 621 - 628 (1978)
113. THOMAS F., SZENPETERY S.S., WOLFGANG T.C., QUINN J.E., THOMAS J., LOWER R.:
Improved immunosuppression for cardiac transplantation: Immune monitoring and individualized modulation of recipient immunity by in vitro testing.
Am.Thorac.Surg.28: 212 - 223 (1977)
114. THOMAS F., SZENPETERY S.S., THOMAS J., WOLFGANG T.E., MAMMANA R.E., LOWER R.:
Pre- and posttransplantation immunologic monitoring assays for human cardiac transplantation.
Transpl.Proc.11: 1239 - 1240 (1979)
115. THOMPSON J.F., CARTER N.P., BOLTON E.M., WOOD R.F.M., MORRIS P.
The composition of the lymphocyte infiltrate of rejecting human kidney allografts is not reflected by lymphocyte subpopulations in peripheral blood.
X International Congress of the Transplantation Society, Minneapolis, Abstract S.11.1 (1984)
116. ÜBERFUHR P., REICHART B., WELZ A., KREUZER E., KEMKES B.M., KLINNER W., HAMMER C., ERTEL W., REICHENSPURNER H., GOKEL J.M., LAND W., FRANKE N., MATTHES P.:
Bericht über eine erfolgreiche Herztransplantation in Deutschland.
Klin.Wschr.60: 1435 - 1442 (1982)

117. WARNECKE H., HETZER R., SCHÜLER S., GOETZE H.J., SCHÄFERS H.J.,
BLAZEK J., MEYER K.D., SÜTHOFF U., BORST H.G.:
Das intramyokardiale Elektrokardiogramm zur nichtinvasiven
Abstoßungsdiagnostik nach Herztransplantation.
Thorac.Cardiovasc.Surg.33: 44 (1985)
118. van WAUWE J., GROSSENS J., DECOCK W., KUNG P.C., GOLDSTEIN G.:
OKT3: A monoclonal antibody with potent mitogenic properties.
J.Immunol.124: 2708 - 2711 (1980)
119. WENDT F.:
Kleines Vademecum Haematologicum.
Normann Werke GmbH, Hamburg (1980)
120. WHITE D.J.G.:
Cyclosporine A.
Elsevier Biomedical Press (1982)
121. WILLIAMS D., GRIESSEDIECK C., THOMAS J., WITHLEY T., GANGHOFF O.
GROSS U., THOMAS F.:
Improved human kidney graft survival using individualized
monoclonal antibody monitoring and immunmodulation.
X International Congress of the Transplantation Society,
Minneapolis, USA: Abstract S.11, 5 (1984)
122. YACKIE A., MIGAEAKI T., NAGAOKI T., YOKOI T., MUKAI M.,
UWADANA M., TANIGUCHI N.:
Regulation of T-cell subsets defined with monoclonal
antibodies OKT4 and OKT8 monoclonal antibodies in human
chord blood.
J.Immunol.127: 1314 - 1318 (1981)

G ANHANG

Besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr.Dr.W.Klinner und Herrn Professor Dr.Dr.W.Brendel für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit der lehrreichen Mitarbeit in ihrem jeweiligen Kliniksbereich. Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr.B.Reichart, Herrn Professor Dr.B.Kemkes und Herrn Professor Dr.Dr.C. Hammer für die optimale und verständnisvolle Betreuung während meiner Tätigkeit. In Vertretung von allen Mitarbeitern des Instituts für Chirurgische Forschung und der Herzchirurgischen Universitätsklinik München möchte ich mich speziell bei Herrn Dr.C.Lersch und Herrn Dr.P.Überfuhr für die freundschaftliche Kooperation bedanken. Ausdrücklicher Dank gilt noch meinem Studienkollegen Herrn cand. med. W.Ertel, der mir bei der Erarbeitung dieser Studie immer zur Seite stand.

Lebenslauf

Hermann Christoph Konrad REICHENSPURNER

- Geboren 20.4.1959 in München
- Konfession: Römisch-katholisch
- Vater: Hermann Reichenspurner, Diplomkaufmann
Mutter: Anna Reichenspurner, geb. Aumüller, Geschäftsinhaberin
- 1965 - 1969 Besuch der Volksschule München - Berg am Laim
- 1969 - 1978 Besuch des Humanistischen Wilhelmsgymnasiums München
- Mai 1978 Erreichen der Hochschulreife (Durchschnittsnote 1,8)
- April 1979 Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- August 1980 Physikum
- Dezember 1980 Beginn einer experimentellen Doktorarbeit bei Herrn Professor Reichart und Herrn Professor Hammer im Institut für Chirurgische Forschung in München. Thema:
"Zytologische und immunologische Untersuchung herztransplanterter Patienten".
- August 1981 I. Staatsexamen
- Oktober 1981 Famulatur bei Herrn Dr. H. Holzgartner, Facharzt für Innere Medizin
- März 1982 Famulatur an der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie des Deutschen Herzzentrums München
- August - Oktober 1982 Famulatur an der Herzchirurgischen Klinik der Stanford University, USA
- April 1983 Famulatur in der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Prien am Chiemsee
- März 1984 II. Staatsexamen
- April 1984 Beginn des Praktischen Jahres an der Medizinischen Klinik I des Klinikums Großhadern
- Mai 1984 Verleihung des "Philip K. Caves Preis" der International Society for Heart Transplantation
- August 1984 2. Tertial des Praktischen Jahres an der Chirurgischen Klinik der Universität München, Klinikum Großhadern
- November 1984 3. Tertial des Praktischen Jahres an dem Anaesthesiologischen Institut der Universität München, Klinikum Großhadern
- April 1985 III. Staatsexamen
- 1. Juni 1985 Beginn der Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft an der Herzchirurgischen Universitätsklinik München (Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Klinger)

